КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА В ВЕТЕРИНАРИИ

618
К 483

КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА В ВЕТЕРИНАРИИ

СПРАВОЧНОЕ ИЗДАНИЕ

312482

МОСКВА АГРОПРОМИЗДАТ 1985

ББК 48
К49
УДК 619:616—071(031)

Авторы: *И. П. Кондрахин* (профессор), *Н. В. Курилов* (профессор), *А. Г. Малахов* (профессор), *А. В. Архипов* (профессор), *А. Д. Белов* (профессор), *И. М. Беляков* (канд. вет. наук), *Н. И. Блинов* (канд. биол. наук), *А. В. Коробов* (канд. вет. наук), *Л. А. Фролова* (канд. хим. наук), *Н. А. Севастьянова* (канд. вет. наук).

Рецензент: доктор ветеринарных наук, профессор *Н. А. Судаков*.

К49 **Клиническая** лабораторная диагностика в ветеринарии: Справочное издание/И. П. Кондрахин, Н. В. Курилов, А. Г. Малахов и др. — М.: Агропромиздат, 1985. — 287 с., ил., 4 л. ил.

В книге рассматриваются методы исследования крови, мочи, рубцового и желудочного содержимого, радиоиммунного анализа гормонов и биологически активных веществ. Приведены физиологические константы разных видов животных и отклонения показателей при внутренних незаразных болезнях. Дана характеристика приборов, лабораторного оборудования, а также способы подготовки посуды и реактивов для диагностических исследований.

Для ветеринарных специалистов.

К $\frac{3805040000-055}{035(01)-85}$ 199—85 ТП изд-ва «Колос» ББК 48
636.09

© ВО «Агропромиздат», 1985

Ветеринарные специалисты страны решают сложные и ответственные проблемы по созданию здоровых стад, максимальному сохранению поголовья животных, производству продукции высокого санитарного качества и биологической ценности. Ветеринарная наука и передовая практика вносят весомый вклад в ускорение научно-технического прогресса в животноводстве. Лечебно-профилактическая работа строится с учетом интенсификации отрасли на базе специализации и концентрации производства, внедрения промышленных технологий.

Реализация Продовольственной программы [redacted] требует от ученых и практических ветеринарных работников мобилизации резервов, которые могут существенно улучшить ветеринарное обслуживание непрерывно развивающегося животноводства. Немаловажную роль в комплексе ветеринарных мероприятий призвана сыграть диспансеризация. Последняя, в свою очередь, основана на клинических и лабораторных исследованиях. Знание обменных процессов, в каком направлении они идут в организме группы животных позволяет судить о здоровье целого стада и своевременно организовать лечебно-профилактические мероприятия.

В настоящей работе рассмотрены методы лабораторных исследований, которые помогут распознать и изучить патологические ранние изменения, происходящие в организме животного, объективно оценить состояние обмена веществ, деятельность органов и систем, своевременно поставить диагноз, уточнить причину болезни. Многие из общеклинических, гематологических, биохимических и других методов исследования стандартизированы, унифицированы, то есть они отвечают требованиям специфичности, правильности, воспроизводимости и чувствительности.

В справочнике широко представлены методы исследования крови, молока (молозива), мочи, желудочного содержимого. Отдельный раздел посвящен исследованиям новорожденных животных.

Следует помнить, что точность и ценность результатов, получаемых тем или иным методом, зависит от многих факторов: выбора самого метода; подготовки оборудования, приборов, посуды и реактивов, особенно калибровочных материалов; условий взятия, транспортирования и хранения проб биологического материала, антикоагулянтов и консервантов. Учитываются также однородность групп животных, их возраст, пол, клиническое состояние и экзогенные факторы (кормление, микроклимат в помещении, возможное воздействие химических и биологических средств и т. п.). При оценке результатов не исключаются качество и добросовестность выполнения анализа.

При подготовке справочника авторы использовали материалы официальных источников (по унифицированным методам), данные отечественных и зарубежных исследователей, а также результаты собственной научно-исследовательской деятельности.

ОСНОВНЫЕ ОБМЕННЫЕ ПРОЦЕССЫ И ИХ МЕТАБОЛИТЫ

Обмен веществ и энергии — совокупность превращений веществ и энергии в организме, обеспечивающих его жизнедеятельность. Образующаяся в процессе обмена веществ энергия используется для поддержания температуры тела, совершения работы, роста и развития организма и обеспечения структур и функций всех клеточных элементов. Следовательно, обмен веществ и превращение энергии неразрывно связаны между собой и составляют единое целое. Обмен веществ и энергии включает два основных, непрерывно связанных между собой процесса — ассимиляцию и диссимиляцию. Ассимиляция (или анаболизм) — совокупность химических реакций, необходимых для использования и переработки веществ, поступающих в организм из внешней среды, и образования из них сложных химических соединений, составляющих цитоплазму клеток. Связана ассимиляция с потреблением энергии. Диссимиляция (или катаболизм) — процесс распада веществ, входящих в состав клеток и поступивших извне, на более простые соединения, которые затем выделяются в окружающую среду как продукты жизнедеятельности.

Биохимические реакции обмена веществ и энергии происходят в субклеточных структурах в определенной последовательности и осуществляются с помощью ферментов.

Обмен веществ и энергии включает три этапа. Первый — пищеварение — процесс механической и химической обработки составных частей корма в желудочно-кишечном тракте и всасывание. Второй этап — промежуточный обмен, включающий процессы ассимиляции и диссимиляции, сопровождающиеся образованием большого количества промежуточных и конечных продуктов обмена. Все процессы промежуточного обмена происходят ступенчато. Например, такое низкомолекулярное вещество, как молочная кислота $C_3H_6O_3$, превращаясь в конечные продукты обмена CO_2 и H_2O, проходит целый ряд промежуточных ступеней, в которых реакции распада чередуются с процессами синтеза. Третий этап — образование и выделение конечных продуктов обмена из организма с мочой, калом, выдыхаемым воздухом и т. д.

В процессе обмена веществ в организме образуются особые вещества — метаболиты. К ним относят аминокислоты, жирные и ароматические кислоты, пуриновые и пиримидиновые основания, простые сахара, амины, гормоны и другие соединения, а также вещества, поступающие в организм в готовом виде, — витамины, аминокислоты, моносахариды и другие природные соединения.

Соотношение между количеством энергии, поступившей с питательными веществами корма, и количеством энергии, отдаваемой во внешнюю среду, называется *энергетическим балансом организма*. Определение этого баланса имеет большое значение, особенно для расчета кормовых рационов. Коэффициент полезного действия (КПД) реакций обмена веществ и энергии выражается количеством энергии, которое превращается в работу при данной температуре.

Различают понятия «общий обмен веществ, или просто обмен веществ» и «основной обмен». Общий обмен веществ — обмен белков, углеводов, липидов и других веществ, а основной обмен — тот же общий обмен, но минимальный по интенсивности и необходимый для поддержания жизни в условиях абсолютного покоя организма. Интенсивность основного обмена у каждого животного постоянная, но в то же время она является индивидуальной величи-

ной и зависит от массы, роста, пола и возраста животного. Основной обмен резко отклоняется от нормы при различных патологических состояниях, и поэтому его определение может служить дополнительным диагностическим при-[illegible]

УЧАСТИЕ ВИТАМИНОВ, ФЕРМЕНТОВ И ГОРМОНОВ В ОБМЕНЕ ВЕЩЕСТВ

Витамины — это низкомолекулярные органические соединения, синтезируемые главным образом растениями и частично микроорганизмами. Особенность витаминов — их необычайно высокая биологическая активность. Некоторые витамины образуются в результате химических преобразований веществ в животных тканях — являющихся их предшественниками — провитаминами; например, из каротина образуется витамин А, а при ультрафиолетовом облучении эргостерина — витамин *D*.

В клетках животных витамины содержатся в различных состояниях — в виде свободных форм, в форме фосфорилированных и белковых соединений. Большинство витаминов является исходным материалом для биосинтеза коферментов, простетических групп белков и гормонов и, следовательно, выступает в качестве регуляторов обменных процессов.

Болезни, возникающие вследствие полного отсутствия витаминов (или одного из них) в корме или при нарушении усвоения, называются авитаминозами, а болезни, обусловленные недостаточным поступлением их с пищей или недостаточным усвоением — гиповитаминозами. У животных чаще встречаются последние. Классическая картина авитаминозов и гиповитаминозов может возникнуть у животных при поступлении в их организм, наряду с витаминами и веществами, близких по структуре к ним, но не обладающих их биологической активностью, называемых антивитаминами.

Большинство нарушений обмена веществ при гиповитаминозах обусловливается расстройством активности ферментов, так как многие витамины входят в состав коферментов. Впервые на взаимосвязь между витаминами и ферментами указал академик Н. Д. Зелинский еще в 1922 г. Он писал, что витамины регулируют обмен веществ не непосредственно, а опосредственно через ферментные системы, в состав которых они входят. Открытие витаминов и антивитаминов не только позволило разработать меры профилактики и лечения многих незаразных заболеваний, но и сыграло определенную роль для разработки и лечения многих инфекционных заболеваний. Так, большинство бактерий для своего роста и размножения нуждается в наличии парааминобензойной кислоты, введение же в организм сульфаниламидных препаратов, являющихся ее структурными аналогами, или антивитаминами, приводит к гибели микробов.

Антивитамины обычно блокируют активные центры ферментов путем вытеснения производных витаминов из активного центра и тем самым вызывают конкурентное торможение их активности. Таким образом, гиповитаминозы у животных могут быть экзогенного и эндогенного происхождения. Экзогенные гиповитаминозы возникают при недостаточном поступлении витаминов с кормами. Гиповитаминозы эндогенного происхождения могут обусловливаться следующими причинами: 1) повышенной потребностью в витаминах при беременности, лактации, тиреотоксикозе и других физиологических и патологических состояниях; 2) заболеваниями пищеварительного канала, сопровождающимися нарушением процессов всасывания витаминов; 3) усиленным распадом витаминов в кишечнике под влиянием развития в нем микрофлоры; 4) патологическим состоянием печени, что ведет к нарушению поступления желчи и всасывания жиров и жирорастворимых витаминов. Следовательно, познание закономерностей развития гипо- и авитаминозов, их клинической картины и биологической роли витаминов имеет большое практическое значение для ветеринарного врача.

Ведущая роль в обмене принадлежит **ферментам.** Все процессы обмена веществ, катализируемые ферментами, протекают с намного большей скоростью,

чем соответствующие химические реакции, совершающиеся вне организма. Следовательно, ферменты представляют собой биокатализаторы биохимических процессов обмена веществ, осуществляющихся в организме животных при «мягких» условиях — температуре 38—40°С и pH 1,2—8,0.

Все ферменты по своей природе являются белками, многие из них получены в кристаллическом виде и делятся на две группы: 1) однокомпонентные ферменты — это простые белки, в состав которых входят только альфа-аминокислоты; 2) двухкомпонентные ферменты, в их состав входит белковая часть — апофермент и небелковая часть — кофермент. Коферменты связаны с апоферментом лабильно и легко диссоциируют. Если небелковая составная часть у двухкомпонентных ферментов прочно связана с апоферментом и неспособна к диссоциации, ее называют *простетической группой*. Чаще всего в состав простетических групп входят ионы металлов (Fe, Zn, Mg, Mn, Mo, Cu, Co и др.), а также остатки фосфорной кислоты.

Количество коферментов невелико, потому что каждый из них может входить в состав многих ферментов, катализирующих различные биохимические реакции. Это обусловлено тем, что коферменты непосредственно участвуют в химических реакциях, катализируемых ферментами, а специфичность катализируемых реакций определяется апоферментом. Например, аминотрансферазы и декарбоксилазы аминокислот содержат один и тот же кофермент — витамин B_6. Одна и та же аминокислота в обоих случаях может служить субстратом, а различный характер реакций обусловливается разницей в природе соответствующих апоферментов.

Все коферменты являются производными витаминов или нуклеотидов. Как уже было отмечено, биологическое значение витаминов обусловлено тем, что они участвуют в обмене веществ в качестве коэнзимов.

Витамины могут выполнять функции коферментов как непосредственно, так и после превращения в свои производные. Из производных витаминов наибольшее значение имеют их фосфорные эфиры, например пиродоксальфосфат — фосфорный эфир витамина B_6, тиаминопирофосфат (ТПФ) — фосфорный эфир витамина B_1 и др. Нуклеотиды и нуклеозиды выполняют функции коферментов в форме динуклеотидов, в состав которых часто входят и витамины,—никотинамидадениндинуклеотид (НАД), никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ), флавинмононуклеотид (ФМД), флавинадениндинуклеотид (ФАД), аденозинтрифосфат (АТФ) и др.

Тетрапиррольные коферменты — это ферменты, по своему строению аналогичные структуре гема в гемоглобине. Они содержат ионы железа, которое может находиться в двух состояниях окисления — F^{2+} и Fe^{3+}. Эти коферменты входят в состав цитохромов, каталазы, пероксидазы, то есть ферментов, принимающих участие в переносе электронов в цепи биологического окисления. Установлено, что простетические группы ферментов чаще всего включают в свой состав микро- и ультрамикроэлементы, выполняющие роль активаторов. Ферменты, в состав которых входят макро-, микро- и ультрамикроэлементы, называют металлоферментами, или металлоэнзимами.

Однокомпонентные ферменты не имеют коферментов, и ферментативная реакция осуществляется собственно белком, но в реакции участвует не вся полипептидная часть белка, а только ее небольшая часть — *активный центр*. Если в активный центр вовлекаются несколько аминокислотных остатков, то они не обязательно должны располагаться рядом в полипептидной цепи, но быть сближены пространственно, что обеспечивается спецификой трехмерной структуры фермента.

Таким образом, активным центром фермента называется совокупность аминокислотных остатков, вступающих в контакт с субстратом. В составе активного центра различают каталитический участок, непосредственно вступающий в химическое взаимодействие с субстратом, и контактный участок, который обеспечивает специфическое сродство к субстрату и формирование фермент-субстратного комплекса. Первостепенное значение в пространственном сближении аминокислотных остатков активного центра принадлежит дисульфидным связям, но и слабые связи играют важное значение в этом процессе.

В последнее время большое значение придается аллостерическим центрам ферментов. *Аллостерический центр* — участок фермента, связывающий низкомо-

внутренние метаболиты, изменяя при этом третичную структуру ферментного белка и ингибируя его активность. Метаболит, вызвавший аллостерический эффект называют эффектором.

Ферменты — высокомолекулярные белки, их молекулярная масса колеблется от нескольких десятков тысяч до миллионов. Высокомолекулярные ферменты обычно построены из субъединиц. Так, фермент уреаза (М. м. 60 000) построен из 8 субъединиц, глутаматдегидрогеназа (М. м. 1 000 000) состоит из 6 фрагментов (М. м. 250 000), в каждом из которых содержится 6 субъединиц (М. м. 42 000). Субъединицы, или протомеры, в основном сходны друг с другом и имеют одинаковую молекулярную массу. Однако они имеют и индивидуальные различия, главным образом в некоторых деталях первичной и вторичной структуры белковой цепочки. В результате комбинации таких различных субъединиц образуются множественные молекулярные формы одного и того же фермента. Такие различные формы установлены для лактикодегидрогеназы, гексокиназы и других ферментов, которые получили название изоферментов.

Изоферменты — множественные формы одного и того же фермента, выполняющие одни и те же каталитические функции, имеющие кофермент с одинаковой структурой, но различающиеся между собой химическим составом, физико-химическими и другими свойствами апофермента. Например, фермент лактатдегидрогеназа существует в виде следующих пяти изоферментов: H_4, M_4, H_3M, HM_3 и H_2M_2, где «Н» — полипептидные цепи, или субъединицы, преобладающие в ткани сердца, а «М» — в ткани мышц. Все эти изоферменты имеют одинаковую молекулярную массу — 134 000 и содержат по 4 субъединицы с М. м. 33 500. Перечисленные изоферменты обладают одинаковой специфичностью, присущей лактикодегидрогеназе, то есть действуют только на молочную кислоту. Однако различаются между собой по электрофоретической подвижности, обусловленной структурой апофермента. Изоферменты сыворотки крови изучают для дифференциальной диагностики ряда заболеваний, так как различные ткани имеют характерные изоферментные спектры. Это позволяет по свойствам изоферментов, поступающих из клеток, судить о локализации патологического процесса.

Механизм действия ферментов. Ферменты подобно другим катализаторам ускоряют химические реакции за счет снижения энергии активации, то есть энергии, необходимой для перевода всех молекул вещества в активированное состояние при данной температуре. Фермент снижает энергию активации путем образования промежуточного фермент-субстратного комплекса, в котором увеличивается число активированных молекул, способных к реакциям на более низком энергетическом уровне. Образование и превращение фермент-субстратного комплекса включает три стадии: 1) присоединение молекулы субстрата к ферменту; 2) преобразование первичного фермент-субстратного комплекса в один или несколько активированных комплексов; 3) отделение конечных продуктов реакции от фермента. Обычно количество ферментов не определяют в абсолютных величинах (например, в миллиграммах, мг), а судят об их количестве по активности. За единицу (Е) каталитической активности фермента принимается то его количество, которое при оптимальных условиях катализирует превращение одного микромоля субстрата в 1 мин. Удельная активность фермента выражается числом единиц фермента на 1 мг белка.

Основные свойства ферментов. 1. Специфичность действия ферментов бывает абсолютной и относительной. Абсолютная специфичность проявляется в том случае, если фермент действует на одно единственное вещество и катализирует определенное его превращение. Например, фермент уреаза способен расщеплять только мочевину на аммиак и углекислый газ. Большая группа ферментов обладает относительной специфичностью, для которых важно только наличие определенной связи и не важна природа самого вещества. Например, эстеразы катализируют гидролиз сложных эфиров путем разрыва сложноэфирной связи независимо от природы радикалов. 2. Термолабильность, то есть чувствительность ферментов к высокой температуре. Каждый фермент для проявления своей активности требует определенный температурный оптимум. Ферменты млекопитающих, например, проявляют наибольшую активность при температуре тела 37—38°С. 3. Ферменты чувствительны к изменениям pH среды. Каждый фермент имеет оптимум pH, при котором он наиболее активен. Так, для пепсина желудочного сока оптимум pH 1,5—2,5, а для трипсина он 8—9.

Кроме температуры и pH среды, сильное влияние на активность ферментов оказывает присутствие ряда химических соединений. Одни из них повышают активность и называются *активаторами ферментов,* другие, наоборот, угнетают активность и называются *ингибиторами ферментов.* ,

Очень часто роль активаторов ферментов выполняют ионы металлов. Активация ионами металлов заключается в связывании субстрата с ферментом. Ионы металлов в ряде случаев осуществляют активацию строго специфично, то есть для активации какого-либо фермента требуется наличие определенного иона. С другой стороны, ряд ферментов обладает способностью активизироваться большой группой неорганических ионов. Например, щелочная фосфатаза обладает способностью активизироваться катионами Mg^{2+}, Mn^{2+}, Ca^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}. В ряде случаев в активации ферментов участвуют сразу два иона (обычно с различной валентностью). Ферменты, в которых металлы являются постоянными компонентами активного центра, называются *истинными металлоферментами.* Металлы иногда проявляют активирующий косвенный эффект путем связывания присутствующих в среде ингибиторов. В основе активации ферментов могут лежать и другие механизмы. Так, активирующий эффект может проявляться за счет изменения заряда на поверхности белковой молекулы. Другим примером активации является превращение неактивных предшественников, или проферментов, многих протеолитических ферментов в активные ферменты (пепсиногена в пепсин, трипсиногена в трипсин и т. д.). Процесс торможения, или ингибирования, активности ферментов может быть обратимым и необратимым. Необратимое ингибирование происходит в том случае, если ингибитор вызывает стойкие изменения или модификацию функциональных групп фермента, например нагревание свыше 100°С, действие солей тяжелых металлов и т. д.

Обратимое ингибирование делится на конкурентное и неконкурентное. *Конкурентное ингибирование* встречается тогда, когда в среде одновременно имеются в наличии субстрат и сходный с ним по структуре ингибитор. Субстрат и ингибитор конкурируют за активный центр фермента. Тормозящее действие конкурентного ингибитора зависит от концентрации субстрата. Если фермент находится в окружении большого количества молекул субстрата и малого количества молекул ингибитора, то субстрат чаще попадает на предназначенное для него место. В этом случае ферментативная реакция не прекращается, а лишь замедляется. Иногда влияние ингибитора вообще не проявляется. Напротив, если число молекул ингибитора велико, то субстрат не достигает фермента и ферментативная реакция блокируется. По типу конкурентного торможения действуют антихолинэстеразные вещества, такие как фосфорорганические яды, используемые для борьбы с клещами — переносчиками кровопаразитарных заболеваний животных. Кроме того, действие многих лекарственных веществ обусловливается блокировкой по типу конкурентного торможения активных центров ферментов болезнетворных микроорганизмов.

При *неконкурентном ингибировании* ингибитор не имеет структурного сходства с субстратом и повышение его концентрации не вытесняет ингибитора из его комплекса с ферментом, как это бывает при конкурентном торможении. По типу неконкурентного торможения проявляют свое действие цианиды, которые вступают в прочное соединение с трехвалентным железом активного центра цитохромоксидазы и фермент выключается из цепи дыхательных ферментов, что при большой дозе яда ведет к гибели организма. Также действует по типу неконкурентного торможения другой яд — люизит; он блокирует ферменты, содержащие в активном центре свободные SH-группы.

В настоящее время уже известно, что в основе всех патологических состояний лежат нарушения отдельных звеньев химических превращений, протекающих в организме.

Биохимические исследования последних лет позволили установить изменения активности ферментов в сыворотке крови при ряде заболеваний с различной этиологией. У клинически здоровых животных активность ферментов в сыворотке крови относительно невелика по сравнению с их активностью в тканях. Одной из причин повышения активности ферментов в сыворотке крови при поражении целого ряда органов и тканей является нарушение нормальной проницаемости мембран клеток и выход из них ферментов в кровяное русло. Возможно также повышение каталитической активности ферментов, проникаю-

[illegible] в крови из поврежденных органов. Исследование ферментного спектра сы[illegible] позволяет выявить характерные особенности этих спектров при том [illegible] заболевании. Поэтому особое значение для диагностики многих забо[illegible] имеет оснащение ветеринарных лабораторий приборами-автоматами, [illegible] определять ферментный спектр сыворотки крови.

В регуляции обмена веществ первостепенное значение принадлежит нейро[illegible]ной системе, под контролем которой находятся продуктивность, рост и [illegible]производство животных. Регулирование обмена веществ нервной системой [illegible] посредство гормонов.

По химическому строению **гормоны** делятся на четыре группы: 1) гормоны [illegible] природы — гормоны гипофиза, гипоталамуса, поджелудочной железы и некоторые другие; 2) гормоны — производные аминокислот — адреналин, гор[illegible] щитовидной железы; 3) гормоны — производные жирных кислот — про[illegible], 4) стероидные гормоны — производные холестерина — женские и [illegible] половые гормоны, гормоны коры надпочечников. Гормоны первых трех [illegible] действуют быстро, изменяя один или несколько метаболических процес[illegible]. Гормоны щитовидной железы вызывают глубокий и продолжительный эф[illegible]. Стероидные гормоны оказывают действие на геном, стимулируя синтез [illegible] РНК и белков.

Можно выделить гормоны (или эффекты гормонов быстрого действия — [illegible]ренали, норадреналин), стимулирующие активность уже имеющихся фермен[illegible], а также гормоны, действие которых касается активации синтеза белков на [illegible] уровне.

Большое значение для гормонального контроля активности ферментов име[illegible] влияние гормонов на проницаемость клеточных мембран. Увеличение или [illegible]ижение поступления субстратов, активаторов, ингибиторов и других эффек[illegible]ров ферментативных реакций может быть одним из путей воздействия гор[illegible] на активность ферментов.

Многообразие эффектов гормонов не позволяет пока создать единую тео[illegible] действия для всех гормонов. Интеграция различных контрольных механиз[illegible] обеспечивает гармоничное протекание химических реакций, составляющих [illegible] жизненных процессов.

Воздействуя на генетический аппарат, гормоны направляют в ту или иную [illegible]ону синтез биологических катализаторов — ферментов, принимающих непо[illegible]ственное участие в поддержании обмена веществ. Дефект в любом звене [illegible]ложной цепи гормональной регуляции отражается на обмене веществ и ведет [illegible] развитию той или иной патологии.

Таким образом, изучение эндокринного статуса у животных даст ключ для [illegible]ного обоснования к составлению рационов, раннего прогнозирования бу[illegible]щей продуктивности, выявления и исключения нарушений в обмене веществ.

Как известно, глюкокортикоиды и кортикотропин (АКТГ) — основные адап[illegible]ные гормоны, поддерживающие состояние гомеостаза у животных, а гормо[illegible] коры надпочечников, будучи одними из основных регуляторов метаболи[illegible]ских процессов, оказывают мощное влияние на все виды обмена веществ в ор[illegible]ганизме.

ПРОДУКТЫ МЕТАБОЛИЗМА УГЛЕВОДНОГО И ЛИПИДНОГО ОБМЕНА

Углеводный обмен. Ферментативный распад полисахаридов корма начинается в ротовой полости под влиянием фермента амилазы с образованием сложной смеси декстринов. Дальнейший распад углеводов продолжается в тонком отделе кишечника под влиянием ферментов амилазы и мальтазы, поступающих с соком поджелудочной железы, с образованием моносахаридов, или простых сахаров. Моносахариды всасываются в тонком отделе кишечника. В стенке кишечника моносахариды подвергаются фосфорилированию и превращению в глюкозо-6 фосфат, поэтому и фруктоза, и галактоза в кровь поступают только в виде глюкозы. При переходе глюкозо-6-фосфата в кровь из кишечной стенки происходит его дефосфорилирование и глюкоза поступает в кровоток. В большом круге кровообращения глюкоза в норме у всех видов сельскохозяйствен-

ных животных содержится в очень небольших количествах. Так, например, содержание глюкозы в крови колеблется у лошади от 75 до 95 мг%, у свиньи — от 80 до 100, у кролика — от 75 до 95 мг%.

Поступление углеводов с кормом в организм животных в обильных количествах ведет к возрастанию уровня глюкозы только в крови воротной вены, из которой весь избыток глюкозы откладывается в печени в виде гликогена, в оттекающей от печени крови уровень глюкозы вновь становится равным норме. Используется гликоген или глюкоза в качестве источника энергии в две стадии — анаэробной и аэробной. Анаэробное окисление углеводов до пировиноградной или молочной кислоты, начинающееся с гликогена, носит название гликогенолиза, а с глюкозы — гликолиза.

Первый этап. В процессе гликогенолиза при участии фермента фосфорилазы происходит (путем присоединения молекулы фосфорной кислоты) отщепление от гликогена одной молекулы глюкозы с образованием глюкозо-1-фосфата, который под влиянием фермента фосфоизомеразы превращается в глюкозо-6-фосфат. При гликолизе под влиянием фермента глюкофосфокиназы происходит фосфорилирование глюкозы с образованием также глюкозо-6-фосфата, но при этом затрачивается одна молекула АТФ. Под влиянием фермента фосфоглюкоизомеразы глюкозо-6-фосфат превращается во фруктозо-6-монофосфат, к нему под влиянием фермента фосфофруктокиназы переносится с АТФ еще один фосфорный остаток с образованием фруктозо-1,6-дифосфата.

Второй этап. Образовавшийся фруктозо-1,6-дифосфат при участии фермента альдолазы расщепляется на два триозофосфата — 3-фосфоглицериновый альдегид и фосфодиоксиацетон, последний легко изомеризуется в 3-фосфоглицериновый альдегид. Следовательно, на втором этапе анаэробного окисления образуется две молекулы 3-фосфоглицеринового альдегида.

Третий этап. 3-фосфоглицериновый альдегид при участии дегидрогеназы, кофермента НАД и свободной фосфорной кислоты (H_3PO_4) окисляется с образованием 1,3-дифосфоглицериновой кислоты.

Четвертый этап. 1,3-дифосфоглицериновая кислота при участии фермента фосфоглицерокиназы передает один богатый энергией фосфорный остаток на АДФ с образованием 1-фосфоглицериновой кислоты и АТФ. 1-фосфоглицериновая кислота под влиянием фермента фосфоглицеромутазы превращается в 2-фосфоглицериновую кислоту, которая при участии фермента енолазы теряет молекулу воды и преобразуется в фосфоенолпировиноградную кислоту. Фосфоенолпировиноградная кислота отдает богатый энергией фосфатный остаток на АДФ и превращается в енолпировиноградную кислоту, а эта кислота уже при участии пируваткиназы легко переходит в пировиноградную кислоту. Последняя восстанавливается в молочную кислоту. Таким образом, при гликогенолизе и гликолизе образуются четыре молекулы АТФ, из которых могут быть использованы на энергетические потребности организма две молекулы, если исходным веществом была глюкоза, или три молекулы, если исходным веществом был гликоген.

Аэробное окисление углеводов. В тканях нормально функционирующего животного организма при достаточном снабжении кислородом молочная кислота не образуется и анаэробная стадия распада только предшествует дальнейшему аэробному распаду, при котором НАД H_2 отдает кислороду свой водород через цепь переносчиков, а пировиноградная кислота подвергается дальнейшему аэробному окислению. Окисление пировиноградной кислоты начинается с ее окислительного декарбоксилирования, катализируемого сложной ферментативной системой, состоящей из особой дегидрогеназы, нескольких коферментов (тиаминопирофосфат, липоевая кислота, коэнзим А, НАД и системы ферментов катализаторов тканевого дыхания). Все это локализовано в митохондриях. В результате декарбоксилирования образуется ацетилкоэнзим А ($CH_3CO \sim SKoA$), который подвергается дальнейшему превращению в цикле трикарбоновых кислот, или цикле Кребса.

Начальным этапом цикла Кребса является реакция конденсации ацетилкоэнзима А со щавелевоуксусной кислотой (ЩУК). В результате образуется лимонная кислота. На втором этапе последняя подвергается дегидрированию с образованием цис-аконитовой кислоты. Третий этап характеризуется присоединением воды к цис-аконитовой кислоте с образованием изолимонной кисло-

На четвертом этапе происходит дегидрирование изолимонной кислоты и переход ее в щавелевоянтарную кислоту. На пятом этапе декарбоксилирование изолимонной кислоты ведет к ее превращению в альфа-кетоглутаровую кислоту, которая на шестом этапе вновь декарбоксилируется и превращается в янтарную кислоту. Седьмой этап сопровождается окислением янтарной кислоты с превращением ее в фумаровую кислоту. На восьмом этапе фумаровая кислота присоединяет воду и переходит в яблочную кислоту. На девятом этапе яблочная кислота окисляется в щевелевоуксусную.

Декарбоксилирование и окисление пировиноградной кислоты в цикле Кребса дает в образовании 15 молекул АТФ. Поскольку при окислении глюкозы образуются две молекулы пировиноградной кислоты, то число молекул АТФ необходимо удвоить (15×2=30). Следовательно, аэробное окисление углеводов в 15 раз эффективнее гликолитического.

Кроме описанного пути окисления углеводов, существует еще один, первоначально описанный В. А. Энгельгардтом и называемый пентозо-фосфатным. Заключается он в постепенном окислении глюкозо-6-фосфата до трех молекул 3-фосфо- и фосфоглицеринового альдегида. При этом пути окисления глюкозо-6-фосфата образуется в качестве одного из промежуточных продуктов еще рибозо-5-фосфат (его можно использовать для биосинтеза нуклеотидов).

Липидный, или жировой, обмен — обмен нейтральных жиров, которые составляют основную массу липидов организма. Жиры в основном переваривается в тонком отделе кишечника, в частности в двенадцатиперстной кишке, под влиянием липазы и желчи. Происходит эмульгирование жиров с образованием тонкой и устойчивой эмульсии, что в значительной степени повышает гидролитическое действие липаз, поступающих с соком поджелудочной железы. Глицерин, образующийся при гидролизе жиров, хорошо растворим в воде и легко всасывается слизистой оболочкой кишечника. Высшие жирные кислоты (пальмитиновая, стеариновая, олеиновая) в обычных условиях в воде нерастворимы, и поэтому для их всасывания необходимо образование водорастворимых комплексов с желчными (холеиновыми) кислотами. После всасывания холеиновые кислоты в клетках эпителия слизистой тонкого отдела кишечника распадаются на свободные желчные кислоты и высшие жирные кислоты. Свободные желчные кислоты с током крови через воротную вену поступают в печень и вновь переходят в состав желчи. Свободные высшие жирные кислоты в клетках эпителия слизистой оболочки кишечника соединяются с глицерином и образуют новые, специфические для данного организма нейтральные жиры, которые с током крови поступают и откладываются в жировых депо — в подкожной клетчатке и сальниках. По мере надобности жиры из жировых депо поступают в клетки, в которых расщепляются на глицерин и высшие жирные кислоты, а последние поступают в митохондрии и окисляются до CO_2 и H_2O; освобождающаяся при этом химическая энергия аккумулируется в АТФ и частично рассеивается в виде тепла.

Окисление глицерина начинается с фосфорилирования и превращения его в глицеринфосфорную кислоту, которая подвергается окислению с образованием фосфоглицеринового альдегида. Фосфоглицериновый альдегид в дальнейшем окисляется по схеме гликолиза.

Высшие жирные кислоты подвергаются бета-окислению, так как окисляется всегда второй от карбоксила углеродный атом, то есть находящийся в бета-положении. Сущность бета-окисления состоит в том, что вначале жирная кислота активируется путем взаимодействия с коэнзимом А в присутствии АТФ. Активированная жирная кислота дегидрируется с образованием двойной связи между альфа- и бета-углеродными атомами. Затем по месту двойной связи происходит присоединение молекулы воды и образуется бета-гидрооксикислота; последняя снова в бета-положении дегидрирует с образованием бета-кетокислоты. Бета-кислота путем взаимодействия со второй молекулой коэнзима А расщепляется с образованием одной молекулы ацетилкоэнзима А и остатка жирной кислоты, укороченного на два углеродных атома. Остаток жирной кислоты может еще окисляться по описанной выше схеме до тех пор, пока вся углеродная цепь жирной кислоты не распадется на двууглеродные фрагменты ацетилкоэнзима А. В результате полного окисления одного двууглеродного фрагмента любой жирной кислоты образуется 17 молекул АТФ, одна из кото-

рых расходуется на активацию жирной кислоты в самом начале процесса, а 16 молекул АТФ аккумулируют в макроэргических связях 12 ккал×16=192 ккал энергии. Если ацетилкоэнзим А образуется в больших количествах и превосходит возможности окисления в цикле Кребса, то происходит конденсация его молекул друг с другом с превращением в ацетоуксусную кислоту; последняя способна восстанавливаться с образованием бета-оксимасляной кислоты, а декарбоксилирование ацетоуксусной кислоты ведет к образованию ацетона. Ацетоуксусная кислота, бета-оксимасляная кислота и ацетон называются *ацетоновыми* или *кетоновыми телами*. При нарушениях обмена веществ наблюдается усиленная продукция кетоновых тел с выделением ацетона, кетонемия сопровождается ацидозом и нарушением нормального функционирования организма.

Биосинтез нейтральных жиров происходит на основе глицерофосфата, который синтезируется или путем этерификации при участии АТФ, глицерина, или из диоксиацетонфосфата. Глицерофосфат вступает в реакцию с двумя молекулами активированных высших жирных кислот и переходит в фосфатидную кислоту. Причем исходным субстратом для биосинтеза высокомолекулярных жирных кислот служит активная форма уксусной кислоты — ацетил-КоА.

Процесс биосинтеза начинается с образования активной формы малоновой кислоты из ацетил-КоА, углекислоты (CO_2) за счет энергии АТФ при участии фермента, активным центром которого является витамин Н, или биотин. Затем активная форма малоновой кислоты декарбоксилируется, присоединяет еще один остаток ацетил-КоА и преобразуется в ацетоацетил-КоА. Ацетоацетил-КоА, взаимодействуя с НАДФ H_2, присоединяет два атома водорода и превращается в активную форму бета-оксимасляной кислоты. Бета-оксимасляная кислота подвергается дегидратации с образованием активной формы кратоновой кислоты. Последняя по месту двойной связи присоединяет с НАДФ H_2 два атома водорода и превращается в активную форму масляной кислоты. Далее весь цикл этих превращений повторяется, пока не синтезируется соответствующая высокомолекулярная жирная кислота с 16 и 18 атомами углерода.

Фосфатидная кислота теряет свой фосфат, под действием фосфатазы превращается в диацилглицерид. Диацилглицерид реагирует с третьей молекулой активированной высокомолекулярной жирной кислоты и превращается в молекулу нейтрального жира или триацилглицерина.

Таким образом, активная форма уксусной кислоты или ацетил-КоА служит отправной точкой трех важнейших метаболических путей. 1. Окисление в цикле Кребса с выделением 12 молекул АТФ. Механизм этого окисления описан в разделе «Обмен углеводов». 2. Биосинтез жирных кислот. Этот синтез описан выше, и он идет только при наличии достаточного количества энергии в виде АТФ, которая необходима на первой стадии при биосинтезе активной формы малоновой кислоты. 3. Образование кетоновых тел происходит в том случае, если образование ацетил-КоА превосходит возможности окисления его в цикле Кребса, а недостаток АТФ при сахарном диабете, длительном углеводном голодании не позволяет ему включиться в биосинтез высокомолекулярных жирных кислот. В этих случаях происходит конденсация молекул ацетил-КоА друг с другом с образованием ацетоацетила-КоА, избыток которого легко превращается в свободную ацетоуксусную кислоту, которая, восстанавливаясь, превращается в бета-оксимасляную кислоту, а декарбоксилируясь, превращается в ацетон.

ПРОДУКТЫ МЕТАБОЛИЗМА АЗОТИСТОГО ОБМЕНА

Азотистый обмен — это обмен белков и их производных азотистых соединений.

Первый этап азотистого обмена включает ферментативное расщепление белков корма в пищеварительном канале до стадии свободных аминокислот (у животных с однокамерным желудком) и всасывание последних из тонкого отдела кишечника в кровь. Нарушение процессов ферментативного расщепления белков и всасывания аминокислот в пищеварительном канале приводит к усиленному их расщеплению различными гнилостными микроорганизмами в толстом отделе кишечника с образованием токсических протеиногенных

[illegible] путресцина, кадаверина, тирамина, гистамина) и ядовитых ароматических соединений (скатола, индола, фенола, крезола). В норме этих продуктов в организме мало и они обезвреживаются в печени, а при избыточном их образовании возникает общее отравление организма.

Второй этап азотистого обмена — это промежуточный обмен веществ, включающий процессы распада и синтеза белков и их производных и простых соединений. Всосавшиеся в кишечнике аминокислоты и аминосахара, образовавшиеся в результате расщепления тканевых белков, транспортируются кровью в печень и другие органы и ткани. Начальным звеном в процессе биосинтеза белков является переход аминокислот из крови в клетки. Механизм синтеза белка в клетке включает в себя три стадии: ферментативный синтез информационной РНК (и-РНК) на матрице ДНК, активацию аминокислот в цитоплазме при участии АТФ и их соединения с т-РНК, рибосомальная стадия синтеза, когда отдельные молекулы т-РНК с соответствующими аминокислотами подходят друг за другом к полирибосоме и присоединяются своими основаниями к соответствующим кодонам и-РНК. После формирования полипептидной цепи она отходит от полирибосомы в цитоплазму и подвергается дальнейшей организации в белковую молекулу со вторичной, третичной или четвертичной структурой.

Кроме биосинтеза белков, отдельные аминокислоты необходимы для биосинтеза физиологически активных веществ. Например, тирозин необходим для биосинтеза тироксина и адреналина, триптофан — серотонина, глицин — желчных кислот и пуриновых оснований и т. п. Аминокислоты, не использованные для биосинтеза белков и их производных, подвергаются различным ферментативным превращениям и распадаются. Общими для большинства аминокислот являются следующие реакции превращения: дезаминирование, декарбоксилирование и переаминирование, или трансаминирование.

Дезаминирование — реакции, приводящие к потере аминокислотами аминогрупп и к образованию молекулы аммиака. *Декарбоксилирование* — реакции отщепления карбоксильных групп от аминокислот с образованием углекислого газа и протеиногенных аминов, например гистамина, тирамина, путресцина и др. *Переаминирование* — ферментативные реакции обратимого переноса аминогрупп между аминокислотами и кетокислотами без промежуточного образования аммиака. Реакции переаминирования имеют важное значение для синтеза заменимых аминокислот и катализируются аминотрансферазами, которые содержатся во всех тканях животных и появляются в крови при некротических процессах в организме. Поэтому определение активности аминотрансфераз в крови имеет большое клинико-диагностическое значение.

Третий этап азотистого обмена — образование и выделение конечных продуктов обмена из организма, главным образом с мочой, калом и выдыхаемым воздухом. Объективным показателем образования и выведения конечных продуктов азотистого обмена служит содержание остаточного азота в сыворотке крови, в состав которого входит азот мочевины, мочевой кислоты, свободных аминокислот, креатинина, индикана, аммиака, полипептидов и глютамина. Его величина в норме для каждого вида животных колеблется незначительно, а при некоторых заболеваниях резко возрастает.

Большое клиническое значение для суждения о состоянии азотистого обмена в организме животных имеют исследования по определению азотистых компонентов крови белковой и небелковой природы. При определении содержания общего азота в крови или в ее плазме и сыворотке получают величину, характеризующую общее количество азотсодержащих соединений (белков, нуклеиновых кислот, амидов, аминокислот, креатинина, креатина, мочевой кислоты, аммонийных солей, аммиака, солей азотной и азотистой кислот и др.) в исследуемом материале. Известно, что среднее содержание азота в белках составляет 16%, поэтому для пересчета общего азота на белок нужно найденное его общее количество умножить на коэффициент 6,25. В этом случае получают представление о содержании не чистого белка, а так называемого *сырого протеина*. Для определения содержания *истинного общего белка* крови необходимо установить содержание небелкового азота в цельной крови или ее компонентах — плазме и сыворотке.

Небелковый азот составляет 25—30% в крови, включает азот мочевины

(50%), свободных аминокислот (25%), мочевой кислоты (4%), креатина (5%), креатинина (2,5%), аммиака и индикана (0,5%), других небелковых веществ, содержащих азот-полипептиды, нуклеотиды, нуклеозиды, глютатион, билирубин, уробилин, холин, гистамин, а также азот конечных продуктов обмена простых и сложных белков. Небелковый азот крови называют также остаточным азотом, то есть остающийся в фильтрате после осаждения белков. Содержание остаточного азота, а также его состав зависят от способа осаждения белков. Поэтому большинство исследователей предлагают называть *остаточным азотом* тот азот, который остается в фильтрате после осаждения белков трихлоруксусной кислотой.

У здоровых животных колебания в содержании небелкового, или остаточного, азота в крови незначительны и в основном зависят от количества поступающих с кормом белков. Вместе с тем многие патологические состояния сопровождаются резким повышением содержания небелкового азота в крови. Такое состояние носит название *азотемии.* Азотемию в зависимости от причин, ее вызвавших, разделяют на ретенционную и продукционную.

Ретенционная азотемия возникает вследствие недостаточного выделения с мочой азотсодержащих конечных продуктов обмена. Эта азотемия может быть почечного и внепочечного происхождения. Почечная ретенционная азотемия возникает в результате ослабления очистительной (экскреторной) функции почек, и в этом случае увеличение концентрации остаточного азота происходит за счет мочевины. Эту азотемию отмечают при амилоидно-сморщенной почке, гломерулонефрите, пиелонефрите, туберкулезе почек и других заболеваниях. Внепочечная ретенционная азотемия возникает при нарушениях оттока мочи после ее образования в почке при опухолях мочевого пузыря, сдавливании мочеточников, а также в результате тяжелой недостаточности кровообращения, сопровождающейся уменьшением почечного кровотока.

Продукционная азотемия развивается при обильном поступлении азотсодержащих продуктов в кровь в результате усиленного распада тканевых белков. В этих случаях функция почек не нарушена. Продукционная азотемия встречается при большинстве инфекционных заболеваний, лейкозах и других патологических состояниях.

Часто развиваются азотемии смешанного характера, и в этих случаях их трудно отличить друг от друга.

СВЯЗЬ МЕЖДУ ОБМЕНОМ БЕЛКОВ, ЛИПИДОВ И УГЛЕВОДОВ

Обмен веществ представляет собой взаимосвязанный процесс катаболизма и анаболизма органических соединений в организме животных. При катаболизме связь между обменом белков, липидов и углеводов заключается в том, что их распад до конечных продуктов протекает через образование одинаковых промежуточных метаболитов — ацетил-КоА, или его предшественников (пировиноградная кислота), или других компонентов цикла трикарбоновых кислот (щавелевоуксусная, альфа-кетоглутаровая и фумаровая кислоты).

Таким образом, заменяемость органических веществ в энергетическом обмене в тканях животных идет весьма активно, причем энергия, накопившаяся в тканях, при распаде одних веществ может затем затрачиваться на синтез других. Аналогичным образом из промежуточных продуктов распада белков и жиров (3-фосфоглицериновый альдегид, 3-фосфоглицериновая кислота, пировиноградная кислота, ацетил-КоА) возможен и активно протекает, например, биосинтез жира в тканях сельскохозяйственных животных. При дефиците углеводов в организме гликонеогенез происходит из продуктов распада белков (гликогенных аминокислот) и жиров (только из глицерина).

Взаимосвязь белкового анаболизма с метаболизмом других веществ заключается в том, что из продуктов распада углеводов и жиров (пировиноградная, альфа-кетоглутаровая, щавелевоуксусная кислоты и их предшественники) в тканях животных осуществляется биосинтез некоторых заменимых аминокислот (аланин, аспарагиновая, глутаминовая кислоты, пролин, оксипролин, аргинин)

при условии наличия в тканях источников азота, причем из продуктов распада [illegible] эффективен, как предшественник аминокислот, глицерин. Он легко [illegible] в пировиноградную кислоту и другие предшественники тех [illegible], которые синтезируются из углеводов. Возможности синтеза [illegible] радикала аминокислот из жирных кислот исчерпываются образованием только предшественника глутаминовой кислоты (альфа-кетоглутаратной кислоты). Для этого требуется еще наличие щавелевоуксусной кислоты, образующейся из продуктов распада углеводов и белков. Поэтому при белковом голодании для энергетического обмена и биосинтеза аминокислот в первую очередь используются глюкоза и резервные полисахариды.

Биосинтез нуклеиновых кислот происходит из продуктов распада белков (аспарагиновая, глутаминовая кислоты и др.) и углеводов (метаболитов пентозного цикла). В свою очередь, нуклеиновые кислоты распадаются на рибозу и дезоксирибозу, из которых при необходимости образуются углеводы, липиды и углеводородный радикал некоторых аминокислот. Кроме того, распад нуклеиновых кислот является источником азота, используемым тканями для образования аминокислот путем восстановительного аминирования.

Таким образом, обмен веществ характеризуется протеканием тесноувязанных друг с другом химических процессов, ведущая роль в которых принадлежит белку.

ПРОДУКТЫ МЕТАБОЛИЗМА МИНЕРАЛЬНОГО ОБМЕНА

В организме человека и животных обнаруживаются почти все элементы периодической системы Д. И. Менделеева. К числу элементов, постоянно входящих в состав органов и тканей человека и животных, относят азот, калий, натрий, алюминий, кальций, серу, бром, кислород, углерод, ванадий, фосфор, кобальт, магний, фтор, железо, марганец, цинк, медь, селен. Все эти элементы называются биоэлементами, так как установлена их биологическая роль. Делят их на макро- и микроэлементы. Макроэлементы содержатся в тканях в больших количествах по сравнению с микроэлементами (концентрация последних определяется в микрограммах и наноградмах).

Биологическое значение минеральных веществ характеризуется в основном их ролью в поддержании нормального водного баланса и распределении воды в организме, в обеспечении кислотно-щелочного равновесия, в нормализации нервно-мышечной возбудимости и проводимости нервных импульсов, в генерации биотоков и т. д. Кроме того, минеральные вещества входят либо в опорные ткани (кальций, фосфор, магний и др.), либо в биологически активные вещества (фосфор, железо, цинк, медь, марганец и др.), либо в соединения, богатые энергией (сера, фосфор). Минеральные вещества влияют также на ферментативную активность и защитные функции живого организма. В этом отношении большая роль принадлежит кальцию, магнию, фосфору и целому роду микроэлементов.

Особенности обмена некоторых макроэлементов. *Натрий, калий и хлор* участвуют в осморегуляции, входят в состав буферных систем крови и биологических жидкостей, поддерживая этим постоянство внутренней среды организма. Ионы натрия усиливают способность тканей к набуханию. Благодаря асимметрии распределения этих ионов между клеткой и ее средой они способствуют генерации биотоков и передаче импульсов по нервно-мышечным волокнам. Кроме того, ионы Na^+, K^+ и Cl^- стимулируют действие отдельных ферментов (пепсиногена, амилазы и др.).

Натрий и хлор преимущественно содержатся в биологических жидкостях, калий — в клетках. В плазме крови в среднем у человека и животных имеется натрия 300—320 мг%, калия — 15—20 мг%.

Кальций входит в состав скелета и имеет исключительно важное биологическое значение. Он понижает нервную возбудимость, стимулирует деятельность сердца, уменьшает связывание воды тканевыми коллоидами, участвует в свертывании крови и молока, активирует актомиозин, лецитилазу, Ca^{2+}-АТФазу, тормозит активность енолаз, дипептидаз. В плазме крови кальция содержится в среднем 10 мг%, а в эритроцитах — 0,5—1 мг%. Кальций всасывается главным

образом в передней части тонкого отдела кишечника. Выделяется он почками, печенью и эпителием толстого отдела кишечника. У овец, например, 95—99% меченого кальция выводится из организма с мочой. Почки выделяют кальций в пределах 0,5—8,5 мг на 100 мл мочи. У лактирующих животных значительное количество кальция выводится с молоком.

Магний входит в состав костей, активирует ферменты гидролиза АТФазы, в том числе миозиновую, поэтому необходим при мышечных сокращениях. Магний повышает защитные функции организма, активируя биосинтез защитных белков — иммуноглобулинов. Ионы Mg^{2+} стимулируют активность фосфорилазы, енолазы, пептидазы и карбоксилазы. Содержание магния в форменных элементах крови составляет 3 мг%, а в плазме — 1,8—3,2 мг%. Магний всасывается в тонком отделе кишечника, а выделяется через кишечник и почки.

Фосфор входит в костяк, в состав белков (нуклеиновых кислот), липидов, фосфорных эфиров углеводов (глюкозо-1-фосфат, глюкозо-6-фосфат, фруктозо-6-фосфат, фруктозо-1,6-дифосфат) и триозофосфатов. Значение фосфора очень велико: участие в синтезе нуклеиновых кислот, гликолизе и гликогенолизе, окислении жирных кислот, глицерина. Фосфорная кислота входит в состав коферментов НАД, НАДФ, ФАД, а также ДНК, РНК и других физиологически активных веществ. Всасывается фосфор в тонком отделе кишечника, выделяется желудочно-кишечным трактом и почками.

Регуляция обмена воды и минеральных веществ. Повышение осмотического давления в крови и лимфе вследствие увеличения концентрации электролитов рефлекторно возбуждает соответствующие центры головного мозга. Появляется ощущение жажды, утоляемое приемом воды. Под действием нервных импульсов изменяется гормональная регуляция. В частности, усиливается выделение в кровь вазопрессина, который стимулирует всасывание воды в почечные канальцы и тем самым резко уменьшает ее выведение из организма. Моча выводится с более высокой концентрацией солей.

При снижении осмотического давления в биологических жидкостях усиливается выделение воды с мочой и увеличивается задержание натрия и хлора в организме из-за поступления в кровь большого количества гормонов коры надпочечников, под действием которых усиливается функция ионных насосов цитомембран извитых канальцев почек, что обеспечивает реабсорбцию натрия из первичной мочи в кровь.

Следует подчеркнуть, что регулирование водного и солевого обмена происходит интегрированно с обменом других веществ путем влияния на: 1) нормализацию энергетического обмена, связанного с ресинтезом АТФ, необходимой для работы ионных насосов (гормоны щитовидной железы, кортикотропин, кортикостероны и др.); 2) стимуляцию сердечно-сосудистой системы и кровообращения, особенно в почках (альдостерон, кортизон, адреналин и др.); 3) проницаемость клеточных мембран для электролитов и интенсивность работы ионных насосов (альдостерон, ацетилхолин, норадреналин, половые гормоны и др.). Например, альдостерон, половые гормоны задерживают вывод натрия из организма, повышая проницаемость мембран проксимальных канальцев почек для ионов Na^{+} при его реабсорбции из первичной мочи в кровь.

Микроэлементы, их биологическая роль и обмен. Русский ученый В. И. Вернадский заложил основы биогеохимии, изучающей роль живых организмов в распределении химических элементов в биосфере земной коры. Все живые организмы поглощают вещества с пищей и водой и затем, их выделяя, осуществляют обмен с окружающей средой.

В биогеохимическую миграцию вовлечено большинство элементов земной коры. Только часть из них (биоэлементы) являются постоянными компонентами протоплазмы, участвующими в физиологических процессах. К биоэлементам относят и микроэлементы, встречающиеся в организме в минимальных количествах, но оказывающие большое физиологическое воздействие. Содержание микроэлементов в организме животных зависит от количества их в растениях и питьевой воде. Концентрация микроэлементов в растительных кормах, в свою очередь, находится в прямой коррелятивной связи от количества их в почве. В биогеохимических провинциях, где имеется дефицит микроэлементов в почве, отмечается недостаточность их в организме, а в связи с этим встречаются и заболевания животных.

Биологическая роль микроэлементов заключается в следующем: а) они являются кофакторами (входят в состав простетических групп) целого ряда ферментов или компонентами других физиологически активных веществ (кобальт — составная часть витамина B_{12}, а йод — компонент гормонов щитовидной железы), б) микроэлементы влияют на активность и специфичность ферментов. Такое действие микроэлементов объясняется тем, что они изменяют третичную структуру белков ферментов, а в связи с этим сменяется конформация их активных центров и, следовательно, их специфичность и активность. Например, кокарбоксипептидаза при замене ионов Zn^{2+} в среде на ионы Ca^{2+} или Mg^{2+} теряет пептидазную и усиливает эстеразную активность. Аналогичным образом Zn-дипептидаза меняет субстратную специфичность ионов Mn^{2+} или Co^{2+}.

Всасываются микроэлементы преимущественно в тонком отделе кишечника. В крови микроэлементы в основном транспортируются в виде металлопротеиновых комплексов: железо в составе ферритина, медь — церулоплазмина, йод — тиреоглобулина и т. д. Основная масса микроэлементов, поступающая в организм через пищеварительный тракт, выделяется кишечником (60—90%) и меньшее количество с мочой. Рассмотрим влияние некоторых микроэлементов на обмен веществ.

Йод входит в состав гормона тироксина, регулирующего почти все виды обмена веществ. Недостаток его приводит к отставанию молодняка в росте, понижению продуктивности, а у птиц — к снижению яйценоскости. У взрослого крупного рогатого скота при недостатке йода в кормах и питьевой воде развивается зобная болезнь. Средняя потребность у животных в данном микроэлементе равняется 0,4 мг/кг сухого вещества корма. Всасывается йод в тонком отделе кишечника в виде йодидов. Выводится он в основном почками (80%), а также кишечником, кожей, легкими и молочными железами.

Медь участвует в образовании простетической группы енолазы, оксидаз, цитохромоксидазы, тирозиназы и других ферментов; стимулирует кровотворение и биосинтез антител. Недостаток ее в кормах обусловливает развитие лизухи. Суточная потребность животных в меди равняется 5—8 мг/кг сухого вещества корма.

Марганец играет роль активатора окислительного фосфорилирования и входит в состав ферментов — фосфоглюкомутазы, енолазы, фосфофруктокиназы, аргиназы, дипептидазы, фосфатазы. Особенно чувствительны к недостатку марганца птицы, у которых возникает деформация костей ног и крыльев. Потребность у животных в марганце — 40—60 мг/кг сухого вещества корма в сутки.

Цинк входит в состав коферментов кокарбоксилаз, карбооксипептидаз, алкогольдегидрогеназы, активирует деятельность гормонов гипофиза и половых гормонов. Входит в состав фермента карбоангидразы и гормона инсулина и тем самым играет важную роль в промежуточном обмене углеводов. Суточная потребность у животных — 40—80 мг/кг сухого вещества корма.

Кобальт. Недостаток данного микроэлемента в кормах приводит к заболеванию овец и телят акобальтозом. Он стимулирует процессы распада углеводов и активирует фосфоглюкомутазу, аргиназу, влияет на белковый обмен, на отложение фосфора в костях, стимулируя действие костной фосфатазы. В витамине B_{12} содержится 4,5% кобальта. Поэтому недостаток последнего в кормах ограничивает биосинтез и вызывает авитаминоз B_{12}, сопровождающийся анемией.

Селен обладает антиоксидантным действием. Он предохраняет от окисления геминовое железо, повышает иммунобиологическую реактивность организма. При дефиците селена в рационе у животных развивается беломышечная болезнь. Суточная потребность его — 0,1 мг/кг сухого вещества корма.

312482

ЛАБОРАТОРНЫЕ КЛИНИЧЕСКИЕ ТЕСТЫ ПРИ ВНУТРЕННИХ НЕЗАРАЗНЫХ БОЛЕЗНЯХ

Для оценки состояния обмена веществ, функций отдельных органов и систем, диагностики многих болезней используют сотни различных лабораторно-клинических показателей (тестов). Глубина познания физиологических и патологических процессов, диагностическая значимость и надежность исследований зависят от правильности подбора таких тестов. Учитывая ограниченную возможность ветеринарных лабораторий и отдельных исследователей, необходимо осмысленно подбирать перечень наиболее информативных показателей при исследовании биологического материала. Известно, что многие патологические процессы и болезни сопровождаются определенными, характерными изменениями в крови, моче, содержимом рубца и др. Например, для сахарного диабета наряду с изменениями показателей белкового, жирового, минерального обмена характерно, как правило, повышение сахара в крови, появление его в моче. Кетоз сопровождается высоким содержанием кетоновых тел в крови, моче, молоке, содержимом рубца. При болезнях печени изменяются показатели белковообразующей, мочевинообразующей и антитоксической функций, активности некоторых ферментов. При ацидозе рубца снижается pH его содержимого, при пастбищной тетании уменьшается концентрация в крови магния, при нефрите повышается уровень мочевины в крови и т. д.

БОЛЕЗНИ НАРУШЕННОГО МЕТАБОЛИЗМА

Кетоз — преимущественно хроническая болезнь крупного рогатого скота и овец, характеризующаяся накоплением в организме недоокисленных продуктов обмена — кетоновых тел (бета-оксимасляная, ацетоуксусная кислоты и ацетон) и сопровождающаяся вследствие этого дистрофическими процессами в печени, сердце, почках, гипофиз-надпочечниковой системе, щитовидной и околощитовидных железах, а также в других органах.

Патогенез болезни весьма сложен. Под действием различных этиологических факторов нарушается рубцовое пищеварение, в кровь поступает избыточное количество масляной кислоты, аммиака, кетогенных аминокислот при недостаточном притоке глюкозы, пропионовой кислоты и других глюкопластических средств. Неадекватный приток глюкопластических средств ведет в усиленному липолизу, образованию большого количества неэтерифицированных (свободных) жирных кислот (НЭЖК). Создаются условия торможения реакций цикла трикарбоновых кислот, задерживается окисление ацетил-КоА, происходит ресинтез из него ацетоацетил-КоА, ацетоуксусной, бета-оксимасляной кислот и ацетона. В организме накапливаются кетоновые тела.

Поражение печени сопровождается нарушением ее белково- и мочевинообразующей функции, в крови увеличивается содержание грубодисперсного белка, аммиака, снижается концентрация мочевины, повышается активность аминотрансфераз. Гипофункция щитовидной и околощитовидных желез ведет к развитию вторичной остеодистрофии — заболеванию (в отличие от алиментарной остеодистрофии) эндогенного происхождения; в основе его лежит снижение секреции паратгормона, тиреокальцитонина, кортикотропина, глюкокортикоидов. Недостаток паратгормона влечет за собой снижение усвояемости кальция

и фосфора из кормов, организм испытывает их дефицит, наступает мобилизация этих элементов из костяка. Процесс деминерализации кости усиливается при недостатке тиреокальцитонина, который ослабляет резорбцию кости, подавляет мобилизацию кальция из костного депо, способствует фиксации этого элемента костной тканью.

Установлено, что при подавлении функции коркового и мозгового слоя надпочечников резко ослабляется биосинтез 17-кетостероидов, в жидкости рубца угнетается активность ферментов и, таким образом, снижается интенсивность расщепления кормов и извлечения из них минеральных веществ. Функция надпочечников тесно связана с деятельностью гипофиза. В частности, секрецию глюкокортикоидов регулирует гормон передней доли гипофиза кортикотропин, образование которого находится под контролем кортикотропин-рилизинг-фактора гипоталамуса. Таким образом, в патогенезе вторичной остеодистрофии изначальным моментом является перераздражение клеток гипофиз-надпочечниковой системы, щитовидной и околощитовидных желез с последующим угнетением их функции.

Диагностические тесты при остром кетозе: в моче и молоке — обнаружение ацетоновых тел; в крови — определение кетоновых тел, сахара, НЭЖК, летучих жирных кислот (ЛЖК), молочной, пировиноградной кислот, тироксина, кортизола, резервной щелочности; в рубцовом содержимом — pH, концентрации ЛЖК и др. У здоровых животных концентрация ацетоновых (кетоновых) тел в моче достигает 10 мг%, в молоке — 8, в крови 1—6 мг%. У больных животных этот показатель может быть (соответственно): 100—500, 70—80, 15—70 и более. Содержание сахара в крови больных животных снижается до 34 мг% (и ниже) при норме у коров 40—60 мг%, а резервная щелочность — до 37 об% CO_2.

Начальная стадия кетоза сопровождается повышением в крови ЛЖК, НЭЖК, молочной, пировиноградной кислот, тироксина. В рубцовом содержимом отмечают сдвиг pH в кислую сторону, повышение молярной концентрации масляной кислоты, снижение содержания пропионовой кислоты, избыточное образование аммиака, кетоновых тел, изменения видового и количественного состава бактерий и инфузорий, понижение их активности.

При хроническом кетозе и вторичной остеодистрофии диагностическими тестами являются: определение гемоглобина в крови, общего белка и его фракций в сыворотке, содержания мочевины, кетоновых тел, глюкозы, кальция, фосфора, резервной щелочности в крови, белково-осадочные пробы и др. В отличие от острого кетоза содержание кетоновых тел в крови, моче и молоке соответствует верхним пределам нормы или несколько превышает их. Отмечают снижение гемоглобина, повышение преимущественно общего белка сыворотки крови за счет грубодисперсных фракций, снижение мочевины, общего и ионизированного кальция, резервной щелочности, сахара, положительные белково-осадочные пробы, повышение активности аспартатаминотрансферазы, лактатдегидрогеназы.

Сходной по происхождению и развитию со вторичной остеодистрофией у коров считается эндогенная остеодистрофия у бычков при интенсивном выращивании и откорме. Диагностическими тестами при этом являются: содержание кетоновых тел в крови и моче, сахара в крови, общего и ионизированного кальция, неорганического фосфора, резервной щелочности в крови, белковоосадочные пробы сыворотки крови, pH мочи, наличие камней в моче. При данной болезни установлены низкий pH мочи (ниже 6), высокая концентрация ацетоновых тел в моче, повышение кетоновых тел в крови, снижение в ней сахара, кальция, положительная сулемовая проба (И. П. Кондрахин).

Сахарный диабет. Хроническая болезнь, возникающая вследствие абсолютной недостаточности инсулина и сопровождаемая нарушением углеводного, жирового и других видов обмена веществ. Ведущее патогенетическое звено сахарного диабета — нарушение обмена глюкозы, проявляющееся в гипергликемии и глюкозурии. Повышение глюкозы в крови (гипергликемия) — следствие недостатка гипогликемизирующего гормона инсулина или избытка гипергликемизирующих гормонов — глюкагона, адреналина и глюкокортикоидов. Абсолютный или относительный недостаток инсулина приводит к повышению глюкозы в крови, появлению ее в моче, при этом понижается проницаемость клеточных

мембран для глюкозы, аминокислот, жирных кислот, фосфора, калия, натрия. Происходит мобилизация гликогена, жиров и белков с использованием их для синтеза глюкозы (неоглюкогенез). В свою очередь, неоглюкогенез сопровождается накоплением в организме недоокисленных продуктов обмена — кетоновых тел, отмечают кетонемию, кетонурию, сдвиг кислотно-щелочного равновесия в кислую сторону.

Диагностические тесты: содержание глюкозы в крови и моче, неэтерифицированных жирных кислот, общих липидов, холестерина, фосфолипидов, триглицеридов в крови, кетоновых тел в крови и моче, щелочной резерв крови, определение 17-кортикостероидов в моче и др.

При сахарном диабете содержание глюкозы в крови обычно превышает 100—110 мг% (1—1,1 г/л), достигая 200—800 мг%. Глюкозурия — появление сахара в моче — возникает при повышении почечного порога гликемии (130—170 мг%); в моче глюкозы содержится до 3—8%. При ослаблении реабсорбции глюкозы в почечных канальцах и понижении почечного порога глюкозурия может наблюдаться и на фоне нормального содержания сахара в крови; при склерозе же сосудов клубочков и уменьшении фильтрации глюкозы, несмотря на высокую концентрацию глюкозы в крови, возможно даже уменьшение глюкозурии. Усиленное образование глюкозы из жиров и белков сопровождается повышением в крови свободных жирных кислот, общих липидов, холестерина, фосфолипидов, триглицеридов и кетоновых тел.

Параллельно с кетонемией обнаруживают кетонурию и снижение резервной щелочности крови.

В моче, кроме сахара и кетоновых тел, обнаруживают также белок, что указывает на поражение мелких сосудов почек. При подозрении на латентный диабет применяют тесты толерантности к глюкозе (нагрузкой глюкозой).

Несахарный диабет — хроническая болезнь животных, сопровождающаяся нарушением преимущественно водно-солевого обмена. Сущность патологического процесса заключается в уменьшении образования антидиуретического гормона — вазопрессина в задней доле гипофиза, из-за чего нарушается фильтрационная функция почек и реабсорбция воды эпителием канальцев. Вследствие этого вода обильно выделяется, а соли задерживаются в организме.

Тесты на содержание глюкозы и ацетоновых тел в моче отрицательные. В крови содержание глюкозы и кетоновых тел не превышает норму. Основной диагностический лабораторный показатель — низкая относительная плотность мочи.

Гипогликемия поросят. Заболевание молодняка первых двух суток жизни, характеризующееся резкой гипогликемией и азотемией. Такие поросята рождаются от свиноматок при несбалансированном кормлении, недостатке питания. Причиной болезни является переохлаждение. Сущность болезни заключается в неадекватном притоке и потреблении энергетических веществ, в частности глюкозы. У новорожденных поросят очень малый запас жира, поэтому углеводы являются основным источником энергии. При недостаточном поступлении их с молоком начинают усиленно расходоваться гликоген и глюкоза, из-за чего снижается ее уровень в крови. В этих условиях повышается процесс образования глюкозы из жиров и белков (неоглюкогенез). Но так как жира у поросят мало, то неоглюкогенез в основном идет за счет распада белковых компонентов — аминокислот, следствием чего является повышение в крови остаточного азота.

Диагностические тесты: содержание глюкозы, мочевины и гемоглобина в крови. Для гипогликемии поросят характерны понижение глюкозы до 40 мг% (при норме 95—115 мг%) и повышение концентрации мочевины в сыворотке крови до 100—150 мг% (при норме 40—50 мг%). Снижается также и гемоглобин в крови.

Послеродовая гипокальциемия (послеродовой парез) — тяжелое, быстропротекающее, безлихорадочное заболевание, характеризующееся потерей сознания, чувствительности кожи, полупараличеобразным состоянием. Болеют преимущественно высокоудоиные коровы и козы.

Болезнь сопровождается снижением в крови содержания общего кальция до 7,5 мг% (и ниже) при норме 10—12,5 мг%, ионизированного кальция — до 2—3 мг% (и менее) при норме 4,2—5,9 мг% и магния (норма 2—3 мг%).

При участии ионов кальция и магния происходит процесс соединения и диссоциации мышечных белков актина и миозина, вследствие чего осуществляется сократительный акт. В нервно-мышечных синапсах ионы кальция способствуют выделению ацетилхолина (медиатора нервного возбуждения) и связыванию его с холин-рецептором. При избытке ацетилхолина они активизируют холинэстеразу — фермент, расщепляющий ацетилхолин. Ионы магния также активизируют холинэстеразу. Поэтому значительное снижение в крови кальция и магния ведет к нервно-мышечному расстройству, судорогам и парезам. При послеродовом парезе резко снижается количество глюкозы в крови из-за больших затрат ее при родах. Становится все более очевидным, что резкое снижение в крови кальция, вследствие чего наступает парез мышц, связано с нарушением функции гипофиза, щитовидной и околощитовидных желез.

Диагностические тесты: содержание в крови общего и ионизированного кальция, неорганического магния, глюкозы. Для понимания патогенеза болезни целесообразно исследовать кровь на содержание тироксина, тирокальцитонина, паратгормона, кортизола, кортикотропина.

Миоглобинурия — тяжелое, остропротекающее заболевание, сопровождающееся глубоким нарушением обмена веществ, своеобразным изменением мышц, параличами и выделением с мочой миоглобина. Болеют не только лошади, но и крупный рогатый скот. При этом отмечают, что в мышцах из гликогена образуется большое количество молочной и других кислот, которые не успевают ресинтезироваться. Кислые продукты распада гликогена вызывают набухание и уплотнение мышечных волокон, контрактуру мышц. В последующем происходит перерождение, распад мышечных волокон.

Существенно изменяется миоглобин (хромопротеид мышц, мышечный гемоглобин, дыхательный пигмент, обеспечивающий в мышцах кратковременный запас кислорода); связь его с белком мышц становится непрочной, создаются условия для выхода этого вещества в кровь. В отличие от гемоглобина почечный порог у миоглобина низкий и он выделяется с мочой. Продукты распада белков мышц, поступая в кровь, вызывают токсемию, сдвиг кислотно-щелочного равновесия в сторону ацидоза, протеинурию и другие патологические явления.

Диагностические тесты: обнаружение в моче белка, миоглобина, кровяных пигментов, определение pH мочи, содержание в крови эритроцитов, лейкоцитов, гемоглобина, молочной кислоты, сахара, магния, резервную щелочность, гемотокрит, СОЭ, белковоосадочная проба. При тяжелой форме болезни в моче, кроме миоглобина, обнаруживают белок, как результат поражения почек.

При миоглобинурии количество эритроцитов крови вначале увеличивается, затем приходит к норме, а при сепсисе значительно снижается. Скорость оседания эритроцитов (СОЭ) при тяжелом течении болезни резко замедлена, при сепсисе — ускорена, при средней тяжести — вначале замедлена, а затем приближается к норме, при легком течении — в пределах нормы. Величина гематокрита при тяжелом течении болезни снижается до 27—25%. Сыворотка крови розово-красного цвета, при выздоровлении — соломенно-желтого. Содержание общего белка сыворотки крови нередко повышается при поражении печени, осадочная белковая проба положительная. Количество молочной кислоты резко возрастает, а глюкозы снижается. При выздоровлении идет обратный процесс. Гликолитический коэффициент (отношение глюкозы крови к молочной кислоте) при усугублении патологического процесса уменьшается вследствие роста концентрации молочной кислоты, при выздоровлении увеличивается.

Ацидоз рубца — заболевание, возникающее вследствие образования в рубце большого количества молочной кислоты и сдвига pH его содержимого в кислую сторону. Предшествует этому поедание большого количества кормов, богатых легкоусвояемыми углеводами (сахарная свекла, кукуруза в стадии молочно-восковой спелости, зерновые злаковые).

Диагностические тесты: в рубцовом содержимом — pH, количество инфузорий, их активность, содержание молочной кислоты и др.; в крови — содержание молочной кислоты, щелочного резерва и др. Распад углеводов с образованием молочной кислоты, уксусной, пропионовой кислот сопровождается снижением pH рубцового содержимого до 6,5 (и ниже), угнетением жизнедеятельности инфузорий и бактерий рубца, их гибелью. В то же время количество

молочнокислых бактерий в рубце увеличивается. Показательно для этой болезни уменьшение численности микрофлоры рубца, за исключением молочнокислых бактерий, увеличение в рубцовом содержимом, а затем в крови содержания молочной кислоты, снижение в крови щелочного резерва.

Алиментарная остеодистрофия — хроническая болезнь, сопровождающаяся дистрофическими процессами в костной ткани из-за недостаточного поступления с кормом кальция, фосфора, магния, энергетических, белковых и других веществ.

При недостаточном притоке энергии, белковых компонентов, минеральных веществ и витаминов нарушаются процессы образования органического вещества кости, синтеза коллагена, мукополисахаридов, обогащения органического матрикса ионами кальция, фосфора и другими элементами построения кристаллической решетки гидроксиапатита.

Процессы костеобразования протекают с участием витаминов *D*, А, С, многих микроэлементов. Витамин *D* принимает непосредственное участие в усвоении минеральных веществ корма, регулирует уровень кальция в крови. Механизм действия витаминов А, С и микроэлементов связан с ферментами костной ткани — щелочной фосфатазой, каталазой, цитохромоксидазой и др. Так, цинк является активатором щелочной фосфатазы и ингибитором цитохромоксидазы и каталазы. Марганец повышает активность щелочной фосфатазы, при его недостатке нарушается биосинтез гликозамингликанов, выполняющих важную роль в процессах минерализации кости. Остеогенное действие оказывают кобальт и медь. Витамин А участвует в синтезе мукополисахаридов, витамин С — в формировании коллагеновых волокон костной ткани.

Известно, что в костной ткани содержится около 98,5% кальция организма, 83% фосфора, 70% магния, 40% натрия, более 30 микро- и ультрамикроэлементов; она выполняет важную роль в поддержании постоянства гомеостаза в организме, особенно уровня в крови кальция и фосфора. Недостаток этих элементов в кормах длительное время компенсируется за счет костного депо, однако при этом процессы декальцинации и деминерализации кости преобладают над процессами минерализации. Вследствие этого кость обедняется минеральными элементами, происходит ее дистрофия, замещение фиброзной тканью.

Диагностические тесты: содержание в крови гемоглобина, общего белка, общего и ионизированного кальция, неорганического фосфора, магния, лимонной кислоты, каротина или витамина А, резервной щелочности, активности щелочной фосфатазы.

Для алиментарной остеодистрофии характерны значительное снижение гемоглобина, общего белка сыворотки крови, общего и ионизированного кальция, неорганического фосфора, магния, каротина и витамина А, лимонной кислоты, щелочного резерва, повышение активности щелочной фосфатазы. В биогеохимических провинциях, где причиной данного заболевания служит недостаток в кормах и воде марганца и кобальта при избытке стронция, бария и никеля, проводят определение в крови содержания этих элементов.

Гипомагниемия (пастбищная тетания, травяная тетания) — остропротекающая болезнь, характеризующаяся повышенной нервно-мышечной возбудимостью, клоническими и тетаническими судорогами вследствие снижения в крови магния. Магний активизирует холинэстеразу и ускоряет гидролиз ацетилхолина (медиатора нервных импульсов). Возбудимость нервных окончаний при этом тормозится, мышцы расслабляются. При недостатке магния активность холинэстеразы снижается, концентрация ацетилхолина возрастает, повышается нервная возбудимость, появляются судороги.

Диагностические тесты: определение в сыворотке крови магния и общего кальция. При гипомагниемии содержание магния в сыворотке крови снижается до 1,7 мг% (и ниже) (норма 2—3), кальция — до 8,5 мг% (норма 10—12,5).

Уровская болезнь — хроническое энзоотическое заболевание, характеризующееся задержкой роста и развития, остеодистрофией, полиартрозом вследствие недостатка в кормах и воде кальция, фосфора, меди, йода и избытка в них стронция, бария, марганца. Дисбаланс минеральных элементов ведет к нарушению обмена веществ, к гипотиреозу, атрофии передней доли гипофиза, коркового и частичного мозгового слоев надпочечников, половых желез, гиперплазии щитовидной железы, дистрофии костной и хрящевой ткани. Избыточное

поступление в организм солей стронция и бария ведет к отложению их в костях и вытеснению из костной ткани фосфорно-кальциевых солей.

Диагностические тесты: определение в крови количества эритроцитов, гемоглобина, кальция, фосфора, резервной щелочности, СБИ (связанного с белком йода); в кормах и воде — кальция, фосфора, йода, меди; в почве — стронция, бария. В энзоотических очагах в крови животных находят снижение количества эритроцитов, гемоглобина, СБИ, резервной щелочности, кальция, фосфора. В кормах и воде низкое содержание кальция, фосфора, йода. В почве повышенное содержание стронция и бария.

Гипокобальтоз — энзоотическое заболевание животных, обусловленное недостатком кобальта в почве и растениях. Болезнь встречается в некоторых местностях, где содержание кобальта в почве меньше 1,5—2,3 мг/кг, в сене менее 0,05—0,06 мг/кг сухого вещества корма. Биологическая роль кобальта главным образом обусловлена его присутствием в молекуле витамина B_{12}, который регулирует гемопоэз. Кобальт оказывает влияние на азотистый, нуклеиновый, углеводный и минеральный обмены, принимает участие в реакциях трансметилирования и переноса кислорода, активизирует аргиназу, карбоангидразу, альдолазу, щелочную фосфатазу, является остеогенным микроэлементом. Кобальт необходим для нормальной жизнедеятельности микрофлоры преджелудков, синтеза микробиального белка.

Диагностические тесты: определение в крови содержания кобальта, гемоглобина, эритроцитов, общего белка, витамина B_{12}. При гипокобальтозе содержание в крови гемоглобина снижается до 9—5 г%, эритроцитов — до 5—4 млн/мкл, кобальта — до 2,5—2 мкг%, общего белка сыворотки крови — до 7—6,5 г% (и ниже). Количество кальция в сыворотке крови близко к норме, фосфора — несколько выше ее.

Энзоотический зоб — хроническое заболевание, обусловленное йодной недостаточностью, характеризующееся гиперплазией или гипоплазией щитовидной железы, уменьшением выработки тиреотропных гормонов и связанным с этим нарушением обмена веществ. Заболевание появляется в местностях, где содержание йода в почве ниже 0,00001%, в питьевой воде — ниже 10 мкг/л. Относительная йодная недостаточность создается при избытке солей кальция и фтора, поедании большого количества соевых бобов, гороха, арахиса, белого клевера, капусты, содержащих зобогенные вещества. Йод является жизненно необходимым микроэлементом, входящим в состав гормонов щитовидной железы. При недостатке йода снижается синтез тироксина и трийодтиронина, нарушаются углеводный, белковый, жировой и минеральный обмены, замедляются рост и развитие, снижается воспроизводительная функция, понижается активность целлюлозолитической микрофлоры преджелудков.

Диагностические тесты: определение содержания йода в крови, щитовидной железе и молоке, а также в почве, кормах и воде. У больных животных содержание связанного с белком йода в крови (СБИ) снижено до 3 мкг%, в щитовидной железе — до 0,3—0,7 мг%, в молоке коров — до 2—2,5 мкг/л. Кроме того, для гипофункции щитовидной железы характерны снижение в крови содержания кальция и некоторое повышение неорганического фосфора.

Недостаточность и избыточность селена. Селен имеет большое сродство к альфа-токоферолу и обладает свойством антиоксиданта. Витамин Е ингибирует образование перекисей в тканях, селен в составе глютатионпероксидазы разрушает эти токсические продукты. Однако селену присущи и многие другие специфические свойства. При недостатке селена возникает *беломышечная болезнь* — тяжелое заболевание молодняка сельскохозяйственных животных (в том числе и птиц), характеризующееся функциональными и морфологическими изменениями в скелетной мускулатуре и сердечной мышце. У взрослых животных селеновая недостаточность сопровождается жировой дистрофией печени, задержанием последа, снижением продуктивности. При избыточном содержании селена в кормах отмечают так называемую *щелочную болезнь*, характеризующуюся гипохромной анемией. Это связано с тем, что селен, вытесняя серу, фиксируется в устойчивом соединении с белком и образует селенгемоглобин.

Диагностические тесты: определяют содержание селена в кормах, крови, молоке, печени, волосах. В кормовых растениях его содержится от 0,1 до

2 мг/кг сухого вещества, при содержании в кормах менее 0,1 мг/кг селена развивается селеновая недостаточность. Токсическое действие оказывают корма с содержанием селена 3—8 мг/кг. Количество селена в цельной крови различных видов животных колеблется от 5 до 18 мкг%, в эритроцитах его концентрация примерно вдвое выше, чем в плазме. В крови определяют содержание эритроцитов, гемоглобина, неорганического фосфора, активность глютатионпероксидазы. Находят снижение креатина в мышцах и увеличение его в крови и моче, нарастание концентрации неорганического фосфора; активность глютатионпероксидазы снижается.

Гипокупроз — хроническая болезнь, характеризующаяся анемией, извращением аппетита, а у ягнят расстройством координации движений, парезами и параличами. Медь катализирует реакцию включения железа в структуру гема, способствует созреванию эритроцитов, участвует в процессах остеосинтеза, входит в состав церулоплазмина, цитохромоксидазы и многих других ферментов.

Диагностические тесты: определение в крови меди, гемоглобина, эритроцитов, церулоплазмина и др. При недостаточности меди устанавливают анемию, снижение содержания в крови меди, церулоплазмина. При избыточности меди отмечают высокую концентрацию этого элемента в крови, печени, почках.

Гиповитаминоз А (недостаточность ретинола) — хроническая болезнь преимущественно молодняка, при которой происходит усиленное ороговение (гиперкератоз) эпителиальных клеток кожи, слизистых оболочек, дыхательных путей, пищеварительного канала и мочеполовых органов. Кроме того, снижается синтез белков саркоплазмы мышц, затрудняется использование фосфора для оссификации костей, нарушаются функции щитовидной железы и надпочечников. В сетчатке глаза задерживается ресинтез зрительного пурпура — родопсина, развивается гемералопия, то есть неспособность глаза воспринимать слабые сумеречные раздражения (куриная слепота).

Диагностические тесты: определение содержания каротина и ретинола в сыворотке крови, молозиве, молоке, печени. Каротин исследуют только у крупного рогатого скота старше 3 мес. Телята до этого возраста неспособны усваивать каротин из корма и превращать его в ретинол. У овец, свиней, лошадей каротин в сыворотке крови почти не обнаруживают. Содержание каротина и витамина А в крови приведено в приложении 11. Количество ретинола в печени овец 1800—1500 мг/кг, свиней взрослых — 7000—10000, поросят — 1600—2000 мг/кг. Гиповитаминоз А характеризуется низким уровнем каротина и витамина А в биологических субстратах.

Гиповитаминоз *D* (рахит) — хроническое заболевание молодняка, характеризующееся нарушением процесса роста костей вследствие недостатка витамина *D*. У взрослых животных недостаток витамина *D* приводит к развитию остеодистрофии. Витамин *D* повышает проницаемость эпителия кишечника для кальция и фосфора, регулирует минерализацию костной ткани и поступление кальция из кости в кровь, повышает реабсорбцию в канальцах почек фосфатов. В обмене кальция и фосфора витамин *D* участвует вместе с паратгормоном и тиреокальцитонином.

Витамин *D* образуется в организме из 7-дегидрохолестерина при облучении кожи ультрафиолетовыми лучами, а также поступает с кормом. В печени витамин *D* подвергается гидроксилированию, в результате чего холекальциферол превращается в 25-оксихолекальциферол, а эргокальциферол — в 25-оксиэргокальциферол. 25-оксихолекальциферол с помощью специфического транспортного белка переносится в почки, где превращается в 1,25-диоксихолекальциферол. Подобным образом из 25-оксиэргокальциферола образуется 1,25-диоксиэргокальциферол. Эти два метаболита являются основными активными веществами, ответственными за осуществление трансмембранного переноса кальция и неорганического фосфора. Существенная роль в этом процессе принадлежит кальцийсвязывающему белку (СаСБ), локализующемуся на микроворсинках эпителиальных клеток тонкого кишечника. Образуется СаСБ с участием витамина *D*.

Диагностические тесты: определение в крови содержания гемоглобина, кальция, фосфора, активности щелочной фосфатазы. При недостатке витамина *D* снижается содержание в крови гемоглобина, общего и ионизированного кальция, неорганического фосфора, резервная щелочность; повышается ак-

тивность щелочной фосфатазы. Однако при рахите и остеодистрофии снижение кальция в крови бывает маловыраженное, так как его уровень в крови поддерживается за счет мобилизации этого элемента из костной ткани под действием паратгормона. Поскольку для мобилизации кальция из скелета необходим не только паратгормон, но и витамин *D*, то при тяжелом *D*-гиповитаминозе гормон утрачивает это свойство и, несмотря на гиперсекрецию, развивается гипокальциемия.

Таким образом, на первой стадии болезни содержание кальция в крови снижается, а фосфора находится на субнормальном уровне, в последующем содержание кальция достигает субнормального уровня, а фосфора резко снижается. При тяжелой форме рахита и остеодистрофии значительно снижается в крови как фосфор, так и кальций.

Гиповитаминоз Е (недостаточность токоферола) — хроническое заболевание, проявляющееся нарушением функции размножения, перерождением и некрозом печеночных клеток, мышечной дистрофией. Известно семь различных токоферолов, обладающих активностью витамина Е, наиболее активен альфа-токоферол. Токоферолы присутствуют в митохондриях клеток, участвуют в конечных этапах биологического окисления, являются одним из компонентов цитохромной цепочки, передающей электроны кислороду. Они тормозят окисление ненасыщенных жирных кислот, препятствуют образованию перекисей. Токоферолы предохраняют целостность молекул витамина А и каротина от окислительного разрушения в органах животных.

Диагностические тесты: определение альфа-токоферола в плазме крови, печени, молозиве и в молоке. Пределы колебаний содержания витамина Е в крови здоровых животных приведены в приложении 6. В молозиве коров витамина содержится 200—300 мкг%, в молоке — 60—80 мкг%. Дополнительно определяют в крови активность АсАт и АлАт и находят ее повышение вследствие дистрофии печени и сердечной мышцы.

Гиповитаминоз К (недостаточность филлохинона) — хроническое заболевание, характеризуется снижением свертываемости крови и явлениями геморрагического диатеза. Существуют природные витамины K_1 (филлохинон), K_2 (менахинон) и K_3 (менадион). Они синтезируются земными частями растений, а также микроорганизмами рубца и толстого отдела кишечника. Витамин К участвует в синтезе протромбина, проконвертина и ряда других ферментов свертывания крови. Он необходим для обмена макроэнергических фосфорных соединений (АТФ) и креатинфосфата, усиливает действие преднизолона. Недостаточность витамина К ведет к снижению содержания в крови протромбина и других факторов свертывания крови, к появлению кровоточивости тканей, развитию геморрагического диатеза. Наряду с этим из-за уменьшения количества гемоглобина и эритроцитов развиваются признаки анемии.

Диагностические тесты: время свертывания крови, продолжительность кровотечения, ретракция кровяного сгустка, определение в крови эритроцитов, гемоглобина, фибриногена. При недостатке витамина К в крови снижается количество эритроцитов и гемоглобина, медленнее свертывается кровь, увеличивается продолжительность кровотечения.

Гиповитаминоз B_1 — заболевание, обусловленное недостатком витамина B_1 (тиамина) и сопровождающееся расстройством функций нервной системы (полиневриты, парезы, параличи и др.), ослаблением сердечной деятельности, мышечной слабостью, диспепсическими явлениями. Тиамин в форме тиаминпирофосфата является коферментом декарбоксилаз, участвующих в окислительном декарбоксилировании пировиноградной и альфа-кетоглутаровой кислот. При недостатке тиамина в организме накапливаются пировиноградная и молочная кислоты, которые оказывают токсическое влияние на мозговую ткань. Нарушается клеточное дыхание, понижается синтез аденозинтрифосфата, уменьшается мышечный тонус, повышается активность холинэстеразы, усиливается распад ацетилхолина, тормозится процесс окисления промежуточных продуктов обмена в цикле трикарбоновых кислот.

Диагностические тесты: определение в крови пировиноградной и молочной кислот и тиамина, а в печени и молоке тиамина (витамина B_1). В крови крупного рогатого скота и овец уровень пировиноградной кислоты не превышает 2,5 мг%, молочной кислоты — 8—13 мг%. Содержание тиамина в печени

крупного рогатого скота 0,26—0,90 мг/100 г, у свиней — 0,27—0,76 мг/100 г, в коровьем молоке — 400—500 мкг/кг, кобыльем молоке — 160—390 мкг/кг, в овечьем — 600—1000 мкг/кг. При гиповитаминозе содержание тиамина в биологических субстратах снижается.

Гиповитаминоз B_2 (недостаточность рибофлавина) — заболевание, возникающее вследствие недостатка в организме рибофлавина и сопровождающееся поражением кожи, глаз, алопециями, анемией, нервными расстройствами. Рибофлавин при участии АТФ фосфорилируется и превращается в организме во флавинмононуклеотид и флавинадениндинуклеотид — коферменты, принимающие участие в окислительно-восстановительных процессах в составе дегидрогеназ и оксидаз. Патогенез гиповитаминоза B_2 мало изучен.

Диагностические тесты: содержание рибофлавина в крови и печени, гемоглобина в крови. У здоровых животных рибофлавина в крови 8—16 мкг%, в печени крупного рогатого скота — 0,1—3,3 мг/100 г, свиней — 2,9—4,4 мг/100 г. При гиповитаминозе B_2 концентрация рибофлавина в крови и печени значительно снижается.

Недостаточность никотиновой кислоты (PP-гиповитаминоз, пеллагра) — заболевание, возникающее вследствие недостатка в организме никотиновой кислоты (витамин B_5), которое сопровождается поражением кожи, пищеварительного канала и нервной системы. Никотиновая кислота и ее амид — никотинамид участвуют в образовании двух важнейших коферментов: никотинамидадениндинуклеотида (НАД) и никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФ), участвующих в окислительных процессах. При недостатке никотиновой кислоты или аминокислоты триптофана, из которой в организме может синтезироваться витамин PP, нарушаются окислительно-восстановительные процессы и тканевое дыхание, развиваются дистрофические и атрофические процессы в коже, пищеварительном канале, нервной системе.

Диагностические тесты: определение в печени, крови и молоке никотиновой кислоты. Ее содержание в печени (мг/100 г) у взрослого крупного рогатого скота — 7,6—27,5, свиней — 9,7—27,5, телят — 11,5—22,5, у овец — 39,2—46. В коровьем молоке количество никотиновой кислоты 1500—1700 мкг/кг, в молоке кобылы — 580—720 мкг/кг.

Недостаточность пиридоксина (B_6-гиповитаминоз) — заболевание, возникающее вследствие дефицита в организме витамина B_6 и характеризующееся нарушением азотистого обмена, микроцитарной анемией, поражением кожи, признаками судорог, задержкой роста. Пиридоксин в форме кофермента пиридоксальфосфата участвует в трансаминировании, дезаминировании и декарбоксилировании аминокислот. При недостатке пиридоксина в крови понижается количество эритроцитов и гемоглобина, ухудшается ее свертываемость, происходит накопление в организме глутаминовой кислоты, что ведет к повышению возбудимости коры головного мозга и появлению эпилептических припадков и судорог.

Диагностические тесты: определение в крови эритроцитов, гемоглобина, пиридоксина, в моче — ксантуровой кислоты. При B_6-гиповитаминозе количество микроэритроцитов в окрашенных мазках крови составляет 90% и более к общему числу эритроцитов. Снижено содержание гемоглобина, а в крови и молоке — пиридоксина; в моче повышенное количество ксантуровой кислоты.

Недостаточность цианкобаламина (B_{12}-гиповитаминоз) — заболевание, возникающее вследствие недостатка витамина B_{12} и характеризующееся прогрессирующей анемией, исхуданием, задержкой роста. Витамин B_{12} (цианкобаламин, оксикобаламин, нитрокобаламин, аквокобаламин и др.) участвует в переносе метильных групп и водорода, он необходим для процесса кровотворения, образования эпителиальных клеток, функций нервной системы, роста и процессов регенерации. В состав цианкобаламина входят кобальт, циановая группа и белок. При недостатке цианкобаламина развивается анемия, нарушается межуточный обмен белков, углеводов и жиров, задерживаются рост и развитие.

Диагностические тесты: содержание в крови эритроцитов, гемоглобина, гематокрита, цианкобаламина. При B_{12}-гиповитаминозе снижается в крови количество эритроцитов, гемоглобина, цианкобаламина, понижается показатель гематокрита.

Гиповитаминоз С (цинга, скорбут) — заболевание, возникающее вследствие недостатка в организме аскорбиновой кислоты и сопровождающееся расстройст-

ных кровотворения, кровоизлияниями, образованием язв на деснах, опуханием суставов и т. д. Аскорбиновая кислота участвует в окислительно-восстановительных процессах, в образовании основного вещества соединительной ткани, синтезе коллагена, кортикостероидов, в обмене тирозина, в превращении фолиевой кислоты в тетрагидрофолиевую кислоту. При недостатке аскорбиновой кислоты увеличивается проницаемость эндотелия капилляров, повышается порозность кровеносных сосудов, снижаются эритропоэз, фагоцитарная активность лейкоцитов.

Диагностические тесты: содержание в крови эритроцитов, гемоглобина и лейкоцитов, а в крови, моче и молоке — аскорбиновой кислоты. При гиповитаминозе С отмечают нормоцитарную анемию, лейкоцитопению, снижение в крови, молоке и молозиве содержания аскорбиновой кислоты.

БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ

С функциями печени связаны многие обменные процессы. При заболевании печени изменяются показатели азотистого, углеводного, жирового, минерального, витаминного обменов, активность многих ферментов. Большое разнообразие метаболических функций печени, множественность, неоднотипность патологических явлений затрудняют выбор диагностических тестов при заболевании этого органа.

Диагностические тесты: показатели общего анализа крови, содержание в ней билирубина, протромбина, фибриногена, холестерина, общего белка и белковых фракций, НЭЖК, липопротеидов, сахара, гликогена; активность аминотрансфераз, холинэстеразы, аргиназы, альдолазы, сорбитолдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы; время свертывания крови; показатели общего анализа мочи с определением содержания билирубина в ней, уробилина и других желчных пигментов; осадочные пробы.

Детоксикационную функцию оценивают по определению гиппуровой кислоты после введения бензойнокислого натрия или используют бромсульфалеиновую пробу. Введенный внутрь или внутривенно бензойнокислый натрий соединяется в печени с глицином, образуя гиппуровую кислоту. При поражении паренхимы печени синтез гиппуровой кислоты нарушается, количество ее в моче резко снижается, в то же время при механической желтухе оно существенно не изменяется. Бромсульфалеиновая проба является чувствительным тестом для оценки поражения печени, особенно острого гепатита (наблюдают задержку выведения введенного вещества).

Углеводную функцию печени оценивают пробой с галактозной нагрузкой. При поражении паренхимы печени отмечают затяжной характер кривой с длительным повышением сахара в крови.

Белково-образовательную функцию печени оценивают по результатам определения в сыворотке крови общего белка и его фракций, ставят осадочные пробы (сулемовую, тимоловую и др.).

О *мочевинообразовательной функции* печени судят по концентрации в крови мочевины и аммиака.

Выбор диагностических тестов и функциональных проб зависит от предполагаемой патологии печени. При этом учитывают, что при дегенеративных процессах в умеренной степени изменяется активность аминотрансфераз, альдолазы; при цитолизе — поражении гепатоцитов резко возрастает активность аминотрансфераз, сорбитолдегидрогеназы, аргиназы, гистидазы, понижается активность холинэстеразы, возрастает концентрация холестерина в крови; при холестазе резко повышаются концентрация билирубина, активность щелочной фосфатазы и лейцинаминопептидазы крови.

Гепатит сопровождается повышением в крови билирубина (особенно «непрямого»), активности сорбитолдегидрогеназы, аспартатаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, альдолазы, лактатдегидрогеназы, (ЛДГ), снижением альбуминов и повышением глобулинов сыворотки крови (диспротеинемия), снижением мочевины крови, нарастанием аммиака в крови и моче, снижением в печени и крови гликогена, глюкозы, повышением пировиноградной и молочной кислот, положительными осадочными пробами, положительной бромсульфалеиновой пробой и пробой с галактозой.

Для *гепатоза* характерны повышение активности аминотрансфераз, особенно аланинаминотрансферазы, фруктозо-1-фосфатальдолазы, урокиназы, незначительное повышение в крови холестерина, бета-липопротеидов, преимущественно повышение общего белка сыворотки крови за счет глобулиновых фракций, снижение в крови мочевины, положительные осадочные пробы, нередко повышение СОЭ, снижение гемоглобина.

Цирроз печени сопровождается снижением в крови эритроцитов, гемоглобина, лейкоцитов, повышением свободного и конъюгированного (связанного) билирубина; в моче — повышением уробилина и нередко билирубина; задержкой в крови введенного бромсульфалеина или вафавердина; резким снижением альбумина сыворотки крови; преимущественно положительными осадочными пробами; снижением в крови протромбина и фибриногена, активности холинэстеразы; повышением активности аминотрансфераз (АсАт, АлАт); при билиарном циррозе — повышением активности щелочной фосфатазы крови.

БОЛЕЗНИ ПОЧЕК И МОЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЕЙ

У животных часто встречаются нефрит, пиелонефрит, нефроз, мочекаменная болезнь, гематурия и др.

Диагностическими тестами при болезнях почек и мочевыводящих путей являются: в моче — относительная плотность, pH, белок, форменные элементы крови, эпителий почек и мочевыводящих путей, уробилин, билирубин; в крови — остаточный азот, мочевина, общий белок, его фракции, калий, натрий, хлор и др.

Для *нефрита* — воспаления почек с преимущественным поражением клубочков — характерны высокая плотность мочи, наличие в ней эритроцитов и лейкоцитов (гематурия), почечного эпителия, белка; pH кислый. В крови — резкое повышение остаточного азота, мочевины, снижение сывороточного белка, гемоглобина, эритроцитов. Для хронического нефрита характерны протеинурия (до 1%), наличие в моче единичных гиалиновых и зернистых цилиндров, небольшого количества форменных элементов. В крови — снижение сывороточного белка, гемоглобина, эритроцитов, повышение в ряде случаев остаточного азота, мочевины, индикана, холестерина.

Для *пиелонефрита* — воспаления почечной лоханки и почечной паренхимы с преимущественным поражением интерстициальной ткани характерны мутная, иногда кровянистая моча щелочной реакции, умеренное содержание белка в моче, в осадке мочи — почечный эпителий, лейкоциты, а в период обострения — эритроциты и цилиндры; в крови выраженный нейтрофильный лейкоцитоз, анэозинофилия.

Нефроз — заболевание почек с преимущественными дистрофическими изменениями эпителия почечных канальцев сопровождается выраженной протеинурией (до 3—5%), наличием в моче перерожденных клеток почечного эпителия, эпителиальных и зернистых, жировых, восковидных цилиндров, резким снижением общего белка сыворотки крови, увеличением в крови холестерина, хлоридов (до 700 мг%), бета-липопротеидов.

Для *мочекаменной болезни* характерны снижение резервной щелочности крови, кальция, у бычков на откорме — повышение в крови кетоновых тел, высокая их концентрация в моче, по мере развития болезни отмечают гематурию, пиурию, наличие камней в моче.

При *гематурии крупного рогатого скота* — энзоотическом заболевании, характеризующемся поражением почек и мочевого пузыря, находят снижение гемоглобина, эритроцитов (до 3 млн. в 1 мкл); в моче периодически обнаруживают белок, эритроциты, эпителиальные клетки мочевого пузыря и почек. Кровь в моче — наиболее характерный признак гематурии.

АНЕМИИ

Под анемией понимают снижение содержания гемоглобина в единице объема крови, чаще при одновременном уменьшении количества эритроцитов.

Диагностическими тестами при анемиях являются: показатели общего анализа крови (количество эритроцитов, лейкоцитов, гемоглобина, лейкограмма), гематокрита, диаметра эритроцитов, осмотической резистентности эритроцитов, свертываемости крови, длительности кровотечения; наличие в кале и моче скрытой крови, содержание в моче уробилина, а в крови — билирубина, гемосидерина, железа, кобальта, витамина B_{12}, в сыворотке ее — общего белка, белковых фракций.

Разновидностей анемий много. Все они объединены в четыре группы — анемии вследствие: 1) кровопотерь (постгеморрагические), 2) повышения кроворазрушения (гемолитические); 3) недостатка железа, меди, витамина B_{12}, фолиевой кислоты (алиментарные) и 4) нарушения кровообразования (гипо- и апластические).

При *постгеморрагической анемии* отмечают уменьшение количества эритроцитов и гемоглобина; цветной показатель в норме. В последующем обнаруживают эритроциты с базофильной пунктацией, эритробласты, полихроматофилы, увеличивается количество гипохромных эритроцитов, СОЭ ускорена, моноцитоз, базофилия, эозинофилия. При хронической постгеморрагической анемии в крови появляются незрелые формы эритроцитов (ретикулоциты, нормобласты), резко снижается количество эритроцитов и гемоглобина, цветной показатель ниже единицы.

Гемолитическая анемия преимущественно проявляется в виде нормохромной, нормоцитарной анемии в сочетании с желтухой, гемоглобинурией, гемоглобинемией. Отмечают резкое уменьшение в крови количества эритроцитов, снижение их резистентности, повышается количество ретикулоцитов, идет резкое нарастание в крови билирубина (1,6 мг% и выше). Для послеродовой гематурии коров — одной из форм гемолитической анемии — характерно наличие в моче белка, гемоглобина, уробилина. В крови резкое снижение эритроцитов, гемоглобина, увеличение СОЭ. Цветной показатель выше единицы. В мазках крови обнаруживают анизоцитоз, пойкилоцитоз, полихроматофилию, нейтрофилию, тромбоцитоз. В сыворотке крови повышено содержание свободного билирубина.

Алиментарные анемии (железодефицитные анемии, B_{12}- и фолиеводефицитные анемии) развиваются вследствие недостатка в кормах железа, кобальта, витамина B_{12} (фолиевой кислоты), при хронических заболеваниях желудочно-кишечного тракта и печени.

При железодефицитных анемиях понижается содержание гемоглобина при незначительном снижении количества эритроцитов, цветной показатель ниже единицы. В мазках периферической крови отмечают бледные эритроциты (гипохромия), изменение их размеров (анизоцитоз), формы (пойкилоцитоз), преобладание микроцитов. В крови резкое снижение железа.

Для B_{12}- и фолиеводефицитной анемии характерно значительное снижение количества эритроцитов и умеренное снижение гемоглобина. Цветной показатель превышает единицу. В мазках крови встречаются большие, богатые гемоглобином эритроциты — макроциты и мегалоциты. Со стороны белой крови отмечают лейкопению с нейтропенией, эозинопению и моноцитопению. В крови нередко обнаруживают снижение количества кобальта, витамина B_{12} и фолиевой кислоты.

При гипо- и апластических анемиях, возникающих вследствие функциональной недостаточности костного мозга, изменения в крови характеризуются гранулоцитопенией, тромбоцитопенией, снижением гемоглобина и эритроцитов (анемия нормохромная), снижением количества ретикулоцитов, лейкоцитопенией за счет уменьшения количества гранулоцитов.

БОЛЕЗНИ СЕРДЦА

Из болезней сердца у животных наблюдают миокардиодистрофию, травматический перикардит, миокардит, эндокардит.

Диагностическими тестами для этой группы болезней являются содержание в крови эритроцитов, лейкоцитов (с лейкограммой), гемоглобина, активность аспартатаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, лактатдегидрогеназы, время свертывания крови, протромбиновый индекс.

При травматическом перикардите находят резко выраженный нейтрофильный лейкоцитоз, резкое повышение активности аспартатаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы. Для миокардита характерны умеренное повышение количества лейкоцитов в крови со сдвигом ядра влево, увеличение СОЭ, повышение активности лактатдегидрогеназы ($ЛДГ_1$, $ЛДГ_2$), креатинфосфокиназы. Показатели крови и мочи при дистрофии миокарда (миокардозе) зависят от основной причины болезни. Так как частая причина миокардоза у крупного рогатого скота — кетоз, то характер изменений биохимических показателей совпадает с этой патологией. Эндокардит нередко сопровождается гипохромной анемией, умеренным лейкоцитозом со сдвигом ядра влево, увеличением СОЭ. В моче обнаруживают белок, следы крови, как следствие вторичного поражения почек.

БОЛЕЗНИ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ

При болезнях органов дыхания проводят общий клинический анализ крови и мочи, исследуют состояние кислотно-щелочного равновесия, газовый состав венозной и артериальной крови; в сыворотке крови определяют общий белок, его фракции, холестерин, фибриноген.

Острые и хронические воспалительные процессы в органах дыхания сопровождаются умеренным нейтрофильным лейкоцитозом, увеличением СОЭ. При пневмонии, бронхопневмонии, гангрене легких отмечают респираторный ацидоз, уменьшение альбуминов и увеличение глобулинов сыворотки крови, снижение протромбина крови, увеличение фибриногена плазмы, билирубина сыворотки крови.

БОЛЕЗНИ ОРГАНОВ ПИЩЕВАРЕНИЯ

У жвачных животных часто встречаются атония и гипотония преджелудков, ретикулит и ретикулоперитонит, паракератоз рубца, завал книжки, диспепсия у молодняка; у моногастричных животных — гастрит, гастроэнтерит и другие болезни.

Диагностическими тестами служат общие клинические показатели крови и мочи, концентрация мочевины в крови, pH рубцового содержимого, концентрация ЛЖК и аммиака в нем, количество инфузорий, их активность, общая кислотность желудочного содержимого, содержание свободной и связанной соляной кислоты, активность ферментов, увеличение желчи и скрытой крови, желудочный лейкопедез и др.

При гипотонии и атонии преджелудков снижается pH рубцового содержимого, уменьшается концентрация ЛЖК, повышается количество аммиака и молочной кислоты. Количество инфузорий резко уменьшено, преобладают мелкие, малоподвижные их формы. При паракератозе рубца увеличивается концентрация молочной кислоты, снижается pH, уменьшается количество ЛЖК в рубце. Вследствие стойкого поноса наступают обезвоживание организма, сгущение крови, олигурия. Травматический ретикулит и ретикулоперитонит протекают с явлениями нейтрофильного лейкоцитоза, уменьшением количества эозинофилов, в моче обнаруживают белок и индикан.

Гастрит сопровождается характерными изменениями кислотности желудочного содержимого; гастроэнтерит и диспепсия — умеренным лейкоцитозом, увеличением в крови эритроцитов, гемоглобина из-за сгущения крови, снижением резервной щелочности, повышением в крови остаточного азота, главным образом за счет мочевины, низким уровнем в крови гамма-глобулинов, витамина А, повышением в крови пировиноградной и молочной кислот. В сычуге новорожденных телят до заболевания их диспепсией отмечают повышение общей кислотности и соляной кислоты, количество связанной и свободной соляной кислоты падает, активность химозина и других ферментов уменьшается.

ЛЕЙКОЗЫ (ГЕМОБЛАСТОЗЫ)

Для лейкозов характерно изменение лейкограммы периферической крови, появление в ней незрелых, малодифференцированных лейкоцитов в результате возникновения очагов патологического кровотворения в костном мозге, селезенке, лимфатических узлах, печени, почках и других органах.

Диагностическими тестами при лейкозах (гемобластозах) служат: общие клинические показатели крови, дифференцировка клеток крови, определение свертываемости крови, длительность кровотечения, формула периферической крови, выведенная методом лейкоконцентрации, содержание билирубина, показатели пунктата костного мозга, лимфатических узлов, мазков-отпечатков, взятых при биопсии лимфоузлов, данные цитохимических исследований активности щелочной фосфатазы лейкоцитов и др.

При лимфолейкозе отмечают преимущественно выраженный лейкоцитоз, относительный или абсолютный лимфоцитоз (лимфоциты обычно составляют 80—90% и более). В лейкограмме при наличии большого количества зрелых лимфоцитов встречаются незрелые формы: пролимфоциты, лимфобласты. При сублейкемических и алейкемических формах болезни лимфоцитоз менее выражен, проявляется гипохромная или нормохромная анемия. В пунктате костного мозга выявляют лимфоидную метаплазию, уменьшение клеток гранулоцитарного и эритроцитарного ряда. В молоке повышенное количество лимфоидных клеток.

Миелолейкоз сопровождается нейтрофильным лейкоцитозом, увеличенным количеством в крови клеток гранулоцитарного ряда (90—95% и более), среди которых много незрелых форм — миелоцитов, промиелоцитов, миелобластов.

При ретикулезе количество лейкоцитов крови находится на нижнем уровне нормы (или ниже его). В лейкограмме отмечают наличие ретикулярных атипичных клеток, процент эозинофилов и лимфоцитов или в норме, или умеренно повышен (см. цв табл. IV).

Источники: 30, 37, 43, 85, 92, 113.

ПОДГОТОВКА ПОСУДЫ И РЕАКТИВОВ

ПОДГОТОВКА ПОСУДЫ К АНАЛИЗАМ

Химико-лабораторная посуда для клинических и биологических исследований изготавливается из стекла различных марок в зависимости от назначения.

В лаборатории используют *посуду общего назначения* (пробирки, химические стаканы, воронки простые, делительные, капельные, плоскодонные колбы, конические колбы Эрленмейера, кристаллизаторы, промывалки, холодильники прямые и обратные, сифоны для переливания жидкостей и др.), *посуду специального назначения* (аппарат Киппа, эксикаторы, капельницы, каплеуловители, круглодонные колбы, колбы для определения азота по Кьельдалю, колбы Вюрца, Клайзена и другие для перегонки жидкостей, склянки Тищенко для промывания и высушивания газов, хлоркальциевые трубки и др.) и *мерную посуду* (мерные цилиндры, мензурки, пипетки Мора, градуированные пипетки, микропипетки, бюретки объемные, мерные колбы и др.). Кроме стеклянной, при исследованиях применяют также фарфоровую посуду (стаканы, выпарительные чашки, ступки, тигли, воронки Бюхнера, фарфоровые сетки), высокоогнеупорную посуду, металлическое оборудование (штативы, треноги, зажимы, пинцеты, щипцы, тигли и др.), инструментарий (ножницы, ножи и др.).

Для соблюдения точности поставленного эксперимента следует освоить технику лабораторных работ, правила обращения с посудой и приборами по одному из классических руководств.

Особенно большое значение для лабораторных исследований имеет чистота химической посуды; без выполнения этого условия нельзя быть уверенным в точности результата. При мытье посуды необходимо помнить о технике безопасности в лаборатории, соблюдать большую осторожность при работе с концентрированными растворами щелочей, кислот, окислителей.

В зависимости от степени загрязнения лабораторную посуду моют водой, паром, органическими растворителями (диэтиловый эфир, спирты, ацетон, бензин, четыреххлористый углерод и др.), хромовой смесью, другими моющими средствами. Стеклянная посуда считается чистой, если при ополаскивании водой на стеклах не образуется капель и вода стекает тонкой равномерной пленкой.

Если посуда не загрязнена смолой, жирами и другими не растворяющимися в воде веществами, ее моют теплой водой, а для удаления остатков твердых загрязнений используют щетки, волосяные ерши, стеклянные палочки с кусочком резиновой трубки, надетой на ее нижний конец. После мытья водопроводной водой посуду обязательно 2—3 раза ополаскивают дистиллированной водой.

Длительным, но эффективным способом является мытье паром. Паром посуду обрабатывают также после предварительного мытья другими способами. В большую колбу (емкостью 3—5 л) на дно помещают стеклянные капилляры, до половины наливают ее водой, плотно закрывают пробкой, в которую вставлены высокая трубка для вывода пара и воронка для стекания конденсата. На трубку надевают (или укрепляют над трубкой в штативе) предназначенный к мытью сосуд.

Наиболее часто для мытья посуды в лаборатории применяют хромовую смесь, содержащую два сильных окислителя: H_2SO_4 и $K_2Cr_2O_7$. Для ее приготовления в концентрированную серную кислоту (плотностью 1,84 кг/м^3) вносят измельченный порошок дихромата калия и осторожно нагревают в фарфоро-

рой чашке до растворения дихромата (бихромата). На 100 мл концентрированной серной кислоты необходимо 9,2 г кристаллического $K_2Cr_2O_7$.

При мытье хромовой смесью посуду сначала ополаскивают водой, затем наливают хромовую смесь до $^1/_3$—$^1/_4$ объема сосуда и осторожно смачивают все внутренние стенки сосуда. Затем хромовую смесь выливают обратно в ту же склянку, в которой она хранится, посуду тщательно смывают (7—9 раз) водопроводной водой и ополаскивают 3 раза дистиллированной. Сильно загрязненную посуду моют хромовой смесью 2—3 раза или оставляют стоять с хромовой смесью на несколько часов.

Хромовую смесь в лаборатории используют длительное время, до изменения ее цвета из темно-оранжевого в темно-зеленый. С хромовой смесью нужно обращаться очень осторожно, при мытье пипеток и трубок пользоваться резиновой грушей. Для большего эффекта посуду моют подогретой хромовой смесью (до 45—50°). Делают это очень осторожно на горячей водяной бане или предварительно посуду ополаскивают горячей водой.

Посуду после крови, молока, жира, перед тем как ее обрабатывать хромовой смесью, моют в крепкой щелочи (до 40%).

Если посуда загрязнена воском, парафином, минеральными маслами, хромовую смесь не применяют, посуду моют паром или органическими растворителями. Смолистые вещества удаляются также 40%-ными растворами щелочей.

Хорошее моющее средство (например, для бюреток) — смесь концентрированной серной кислоты и пергидроля (30%-ный раствор H_2O_2) в объемном соотношении 5 : 1. Она служит также для многократного использования.

После мытья посуду высушивают на воздухе (на специальной доске с колышками) или в сушильном шкафу.

ПРИМЕНЕНИЕ РЕАКТИВОВ И ИХ ОЧИСТКА

По своему назначению реактивы делят на две основные группы: общеупотребительные и специальные. Общеупотребительные имеются в любой лаборатории: кислоты (соляная, серная, азотная), щелочи (едкий натр, едкое кали, раствор аммиака), оксиды кальция и бария, ряд солей, индикаторы. Специальные реактивы применяют для определенных работ.

По чистоте реактивы бывают химически чистые (х. ч.), чистые для анализа (ч.д.а.), чистые (ч.). Кроме того, имеются реактивы кондиций: технический (техн.), очищенный (оч.), особой чистоты (ос. ч.), высшей очистки (в. оч.), спектрально чистый (сп. ч.). Для реактивов каждой из категорий установлено определенное допустимое содержание примесей. Все применяемые в лаборатории методики должны снабжаться перечнем реактивов с указанием степени чистоты, необходимой для получения точных результатов в данном определении.

Забота о сохранении чистоты реактивов — самое главное правило при работе с ними. Так, просыпанный на стол реактив (неизбежно при этом загрязняющийся) нельзя высыпать в ту же банку, где он хранится. Перед тем как поместить реактив в банку для хранения, ее нужно хорошо вымыть и высушить. Излишки раствора, не использованного в работе, также не рекомендуется выливать обратно в склянку, где он раньше хранился.

Некоторые реактивы при продолжительном хранении изменяются или даже разлагаются. Такие реактивы перед употреблением очищают для повышения точности определения. При этом предварительно можно проверить чистоту препарата с помощью качественных реакций.

Способ очистки реактива (перегонка, фильтрование, перекристаллизация, экстракция) зависит от свойств очищаемого вещества. В отдельных сложных случаях применяют специальные методы очистки (диализ, осаждение, комплексообразование, образование летучих соединений, зонная плавка, хроматография, ионный обмен и др.).

При **фильтровании** необходимо добиваться полной прозрачности фильтрата. Если фильтрат мутный, его пропускают повторно или многократно через один и тот же фильтр. Процесс фильтрования зависит от физико-химических свойств веществ, от соотношения пор фильтра и размеров твердых частиц, отделяемых

от жидкости, других факторов; поэтому важно правильно подобрать фильтрующий материал. Используют фильтровальную бумагу, асбест, кварцевый песок, адсорбенты (активированный уголь, силикагель, отбеливающие земли и др.), стекловолокно, ткани и т. д.

Фильтровальная бумага выпускается в пачках по 100 шт. нарезанная кругами различного диаметра (55, 70, 90, 110, 125, 150, 240, 320 мм) в зависимости от диаметра воронок. Различают бумажные фильтры обычные и беззольные. На каждой пачке указана масса золы фильтра. Если после запятой стоят четыре нуля (например, масса золы одного фильтра 0,00007 г) — фильтр беззольный; при взвешивании на аналитических весах такая масса золы не скажется на результатах взвешивания после сжигания фильтра. Если после запятой три нуля (например, масса золы одного фильтра 0,0003 г) — это обычная фильтровальная бумага.

Различие фильтров по плотности обозначается цветом бумажной ленты, которой оклеивают упаковку готовых фильтров. Розовая (или черная) лента (диаметр пор 10 нм) — наименее плотные, быстропропускающие фильтры; белая лента (3 нм) — фильтры средней плотности, применяемые для отделения большинства кристаллических осадков; синяя лента (1—2,5 нм) — баритовые, наиболее плотные и медленнопропускающие фильтры; желтая лента — обезжиренные фильтры. Выбирая размер фильтра, руководствуются не объемом фильтруемой жидкости, а количеством отделяемого осадка — осадок должен заполнить не более половины объема фильтра, иначе возникнут затруднения с его промыванием.

Фильтрование ускоряется под вакуумом и при нагревании. Для фильтрования под вакуумом собирают установку, состоящую из фарфоровой воронки Бюхнера, колбы Бунзена, предохранительной склянки и вакуум-насоса. При фильтровании жидкость наливают в воронку до половины ее высоты, отсасывание продолжают до тех пор, пока с конца воронки не перестанет капать жидкость; тогда выключают насос, воронку вынимают, находящееся в ней вещество выкладывают на лист фильтровальной бумаги вместе с фильтром, подсушивают, фильтр отделяют от еще влажного осадка.

Кроме фильтрования, разделение смеси жидкости и твердого вещества проводят в центрифугах; особенно это удобно для вязких растворов.

Для получения химически чистых веществ применяют процесс **перегонки (дистилляции)** жидкости. Прибор для перегонки состоит из колбы Вюрца, холодильника и приемника. Перегоняемая жидкость должна занимать не более $^2/_3$ объема колбы. Для облегчения кипения в колбу вносят «кипелки» (стеклянные трубочки, кусочки фарфора и др.).

Некоторые твердые вещества — йод, сера, хлорид аммония и др., способные возгоняться (то есть при нагревании испаряться, минуя жидкое состояние), очищают **возгонкой, или сублимацией.** Простейшее устройство для возгонки — стакан, поставленный на песчаную баню и накрытый круглодонной колбой с холодной водой или часовым стеклом с кусочками льда. На холодной поверхности пары конденсируются в кристаллы. Технический йод (6 частей) перед возгонкой смешивают с KJ (1 часть) и CaO (2 части) и растирают.

Экстракция — извлечение вещества из раствора другим растворителем, не смешивающимся с первым растворителем. Чаще всего используют органические растворители из водных растворов. В основе метода экстракции лежит закон распределения вещества между двумя несмешивающимися жидкостями, а также различная растворимость отдельных веществ в данном растворителе (если вещество извлекают из смеси с другими веществами). Отношение концентраций растворенного вещества в обеих жидкостях называется коэффициентом распределения.

В простейшем случае экстрагирование из раствора проводят в делительной воронке. Раствор, из которого нужно извлечь вещество, наливают в делительную воронку до половины ее и добавляют туда подобранный растворитель (например, диэтиловый эфир, петролейный эфир, бензин, бензол, гексан и др.) в количестве половины взятого раствора. Делительную воронку закрывают, одной рукой придерживают пробку, другой рукой — кран и воронку многократно в течение 15—20 мин перевертывают плавными движениями вверх и вниз, не допуская резкого взбалтывания содержимого, чтобы избежать образования стой-

ких эмульсий. Периодически выравнивают давление, приоткрывая кран в тот момент, когда воронка находится в перевернутом состоянии — краном вверх. По окончании экстракции воронку на некоторое время ставят в высокий стакан или укрепляют в штативе до полного расслоения жидкостей и установления четкой границы между ними. Затем через кран сливают нижний слой жидкости в один сосуд, верхний слой через горло воронки переливают в другой. Иногда экстрагирование повторяют несколько раз. Затем растворитель отгоняют в колбе для перегонки, где и остается вещество. Экстракцию эффективнее проводить несколько раз малыми порциями растворителя.

Очистка вещества **кристаллизацией** из насыщенных растворов основана на неодинаковой растворимости веществ при различных температурах. При некоторой определенной температуре раствор будет насыщенным в отношении одного и ненасыщенным в отношении других веществ. В то время как первое вещество станет при охлаждении выпадать в осадок, другие будут полностью находиться в растворе. Перекристаллизация служит для удаления примесей только из кристаллических веществ. Чтобы перекристаллизовать вещество, готовят его насыщенный раствор в небольшом количестве воды (или другого растворителя), нагретой до 90—95°. Горячий насыщенный раствор фильтруют через воронку для горячего фильтрования с целью отделения нерастворимых частиц. Фильтрат собирают в сосуд, охлаждаемый холодной водой или льдом. При этом очищаемое вещество выкристаллизовывается, а примеси остаются в растворе, поскольку по отношению к ним он не насыщен. Кристаллы отделяют от маточного раствора фильтрованием и сушат между листами фильтровальной бумаги. Для более тщательной очистки перекристаллизацию повторяют.

Высушивание веществ требует особого внимания. При высушивании на воздухе вещество распределяют тонким слоем и периодически перемешивают, для предохранения от загрязнения его накрывают листом чистой фильтровальной бумаги. Высушивание на воздухе — операция продолжительная, его используют в том случае, если вещество негигроскопично, если его нужно получить рыхлым, сыпучим или если оно разлагается при нагревании. Чаще применяют высушивание в сушильных шкафах при нагревании до 65—110°. Сильно гигроскопичные, расплывающиеся на воздухе вещества сушат в эксикаторе, помещая их в открытом бюксе или чашке на фарфоровый вкладыш эксикатора над веществом, энергично поглощающим влагу: хлорид кальция $CaCl_2$, концентрированная серная кислота H_2SO_4, оксид фосфора P_2O_5 и др.

Одна из разновидностей высушивания — прокаливание. Для получения точных результатов вещество до постоянной массы доводится в эксикаторе. Периодически проводят взвешивание определенного количества вещества вместе с чашкой (тиглем), в которой оно находится. Если результат последнего взвешивания отличается от предыдущего не более чем на ±0,0002 г, считается, что вещество доведено до постоянной массы.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ ТОЧНЫХ РАСТВОРОВ

Растворы — гомогенные (однородные) системы, состоящие из растворителя, растворенного вещества и продуктов их взаимодействия. Количество вещества, содержащееся в определенном количестве раствора (или растворителя), называется *концентрацией*. Раствор, содержащий предельное количество вещества при данной температуре, является *насыщенным*. При приготовлении насыщенных растворов добиваются, чтобы этот раствор находился в равновесии с осадком: если по мере растворения новых порций вещества наконец наступает момент, что оно при данной температуре больше не растворяется, а находится на дне сосуда в виде осадка, то раствор над осадком стал насыщенным и его концентрация характеризует растворимость вещества в данном растворителе. Обычно при нагревании растворимость веществ увеличивается. *Ненасыщенные* растворы могут быть разбавленными и концентрированными.

Способы выражения концентрации подразделяют в зависимости от того, в каких единицах выражается: а) количество раствора или растворителя — в единицах массы (г, кг), в единицах объема (мл, л) и б) количество растворенного вещества — в граммах, молях, грамм-эквивалентах. Чаще употребляют

такие способы выражения концентрации, как процентная, молярная, нормальная, титр.

Процентная концентрация выражается по массе и в объемных единицах. Процентная концентрация по массе показывает количество граммов растворенного вещества, содержащееся в 100 г раствора. Например, 20%-ный раствор любого вещества на каждые 100 г раствора содержит 20 г вещества и 80 г воды. Растворы с концентрацией менее 1% считают разбавленными. Объемные проценты применяют редко, главным образом для приготовления растворов из жидкостей (кислот, аммиака, спирта и др.), и указывают объем растворяемой жидкости в 100 мл раствора.

Процентную концентрацию применяют для приготовления приблизительных растворов. При этом количество вещества для расчетов берется округленно, с невысокой точностью (иногда до целых единиц), для чего используют технические весы. При приготовлении точных растворов пользуются нормальной, молярной концентрацией и титром; расчеты ведут с точностью до 3—4-го знака после запятой, вычисленные количества вещества отвешивают на аналитических весах.

Другие способы выражения концентрации. Концентрации веществ в крови, плазме, сыворотке выражают в г% (число граммов вещества в 100 мл субстрата), мг% (число миллиграммов вещества в 100 мл), мкг% (число микрограммов в 100 мл), ммоль/л (миллимоль/л, 10^{-3}), мкмоль/л (микромоль/л, 10^{-6}), нмоль/л (наномоль/л, 10^{-9}). В приложении 7 приведены коэффициенты пересчета этих единиц. Числовое значение в старых единицах умножают на коэффициент пересчета и получают числовое значение в рекомендуемых единицах СИ.

Молярная концентрация, или моляриость, показывает число молей вещества, содержащихся в 1 л раствора. Моль — количество граммов вещества, численно равное его молекулярной массе. Например, молекулярные массы (выраженные в атомных единицах массы*) для H_2SO_4, NaOH, Na_2CO_3 составляют соответственно 98, 40 и 106 а.е.м. Следовательно, 1 моль этих веществ равен для H_2SO_4 — 98 г, для NaOH — 40 г, для Na_2CO_3 — 106 г. Раствор, содержащий 1 моль вещества в 1 л, называется одномолярным, 0,5 молей в 1 л — полумолярным, 0,1 моля в 1 л — децимолярным. Например, децимолярный раствор серной кислоты содержит 9,8 г H_2SO_4 в 1 л раствора.

Нормальная концентрация раствора (н.) показывает число грамм-эквивалентов вещества в 1 л раствора. Понятие «эквивалент» означает такое количество вещества, которое содержит в своем составе одну массовую часть водорода или реагирует с ней в реакции.

Существуют приемы для расчета эквивалентов кислот, оснований, солей. Эквивалент кислоты равен молекулярной массе, деленной на число атомов водорода в молекуле кислоты:

$$Э_{HCl} = M = 36{,}5; \quad Э_{H_2SO_4} = \frac{98}{2} = 49.$$

Эквивалент основания равен молекулярной массе, деленной на число гидроксильных групп:

$$Э_{NaOH} = M = 40; \quad Э_{Ca(OH)_2} = \frac{M}{2} = \frac{74}{2} = 37.$$

Эквивалент соли равен молекулярной массе, деленной на число атомов металла и на валентность металла:

$$Э_{NaCl} = M; \quad Э_{Na_2CO_3} = \frac{M}{2 \cdot 1}; \quad Э_{Al_2(SO_4)_3} = \frac{M}{2 \cdot 3}.$$

---

* Атомные единицы массы (а.е.м.) соответствуют углеродным единицам (у.е.). 1 а.е.м. равна $^1/_{12}$ массы изотопа углерода ^{12}C.

В химических справочниках даются точные значения молекулярных масс и эквивалентов наиболее употребительных веществ, но по вышеприведенным правилам эквиваленты рассчитать нетрудно и без справочника.

Грамм-эквивалент — количество граммов вещества, равное его эквиваленту. Однонормальные растворы содержат 1 г-экв в 1 л раствора, децинормальные — 0,1 г-экв в 1 л раствора. Так, однонормальный раствор серной кислоты содержит 49 г H_2SO_4 в 1 л раствора, децинормальный раствор гидроксида кальция — 3,7 г $Ca(OH)_2$ в 1 л раствора и т. д.

Все вещества реагируют в количествах, пропорциональных их эквивалентам (закон эквивалентов). Так, 1 экв щелочи всегда прореагирует без остатка с 1 экв кислоты, 10 экв щелочи — с 10 экв кислоты и т. д. Поэтому нормальная концентрация раствора является самой удобной для титрования, поскольку титрование основано на реакциях взаимодействия веществ. Количество эквивалентов для раствора вещества заключено в произведении нормальной концентрации раствора на взятый объем: $нV$. Если два раствора прореагировали без остатка, то $н_1V_1 = н_2V_2$. Эта формула отражает закон эквивалентов для растворов.

Титр показывает количество граммов вещества, содержащееся в 1 мл раствора. Если, например, в 10 л раствора растворено 5,843 г серной кислоты, то титр этого раствора равен:

$$T = \frac{5,843}{10\,000} = 0,0005843 \text{ г.}$$

Зная титр, можно рассчитать нормальность, и наоборот:

$$T = \frac{н \cdot Э}{1000}; \quad н = \frac{T \cdot 1000}{Э}$$

В лаборатории чаще употребляют децинормальные растворы, их титры выражаются очень малыми числами: например, для 0,1 н. раствора HCl:

$$T = \frac{н \cdot Э}{1000} = \frac{0,1 \cdot 36,5}{1000} = 0,000365 \text{ г.}$$

Поэтому выражение «титрованный раствор» означает, что концентрация этого раствора известна с большой точностью.

Техника приготовления приблизительных и точных растворов различна. Приблизительные растворы готовят в бутылях и склянках, точные растворы — в мерных колбах. Если точный раствор готовят из навески, ее отвешивают на аналитических весах в бюксе (или на часовом стекле, пергаментной бумаге), затем вносят в мерную колбу через сухую воронку небольшими порциями; обливают бюкс несколько раз небольшими порциями дистиллированной воды, чтобы навеска была внесена количественно — без остатка. Воронку затем также обмывают несколько раз дистиллированной водой. При приготовлении раствора в мерной колбе растворитель наливают сначала до половины ее объема и добиваются полного растворения навески, помешивая раствор круговыми движениями колбы и встряхиванием, после чего полученный раствор дополняют растворителем до метки и тщательно перемешивают (закрыв колбу пробкой и многократно переворачивая ее).

Если для растворения требуется подогревание, то перед доведением объема до метки колбу необходимо охладить до указанной на ней температуры (обычно 20°). При доведении объема раствора до метки последние порции растворителя нужно вносить очень осторожно, по каплям, пока нижний мениск не достигнет уровня метки.

Если раствор в мерной колбе готовят не из навески, а из более концентрированного раствора, порядок операций тот же: внесение концентрированного раствора (через воронку или с помощью пипетки), разведение, перемешивание, доведение объема раствора в колбе до метки, перемешивание.

Готовя растворы в мерной колбе, рассчитывают навеску твердого вещества или количество концентрированного раствора, учитывая объем колбы и требуе-

мую концентрацию приготавливаемого раствора. Полученный в мерной колбе раствор проверяют титрованием, чтобы установить его точную концентрацию. Если растворы в мерной колбе только разбавляют (в 10, 100 раз и т. д.), то полученные разбавленные растворы уже не титруют. Так, для получения 0,01 н. раствора из 0,1 н. раствора в мерную колбу на 100 мл вносят пипеткой Мора 10 мл 0,1 н. раствора и доводят объем водой до метки. Путем последовательного разбавления делают серии стандартных растворов для колориметрии, флуориметрии, нефелометрических определений и т. д. Стандартные растворы обычно готовят непосредственно перед применением.

Для быстрого приготовления точных растворов кислот, щелочей, некоторых солей удобно пользоваться фиксаналами (стандарт-титры) — точно отвешенными и содержащимися в запаянных ампулах количествами веществ, необходимыми для приготовления 1 л 0,1 н. или 0,01 н. растворов. На ампуле указано, какое вещество и в каком количестве (0,1 или 0,01 г-экв) в ней находится. Выпускают фиксаналы в коробках по 10 ампул. Для приготовления раствора сначала теплой водой смывают надпись на ампуле и тщательно обтирают ее. В мерную колбу на 1 л вставляют воронку со стеклянным бойком, острый конец которого обращен вверх, и ампулу осторожно разбивают о боек, давая содержимому вытечь. Затем, не изменяя положения ампулы, ее обильно промывают дистиллированной водой, после чего ампулу удаляют, а раствор доливают до метки и перемешивают (закрыв колбу пробкой). Кроме жидких, существуют и сухие фиксаналы. В этом случае необходимо, чтобы воронка была сухая.

В СССР выпускают фиксаналы серной кислоты H_2SO_4, соляной кислоты HCl, едкого натра $NaOH$, едкого кали KOH, карбоната натрия Na_2CO_3, гидрокарбоната натрия $NaHCO_3$, хлорида натрия $NaCl$, хлорида калия KCl, щавелевой кислоты $H_2C_2O_4$, оксалата натрия (щавелевокислого натрия) $Na_2C_2O_4$, оксалата калия $K_2C_2O_4$, оксалата аммония $(NH_4)_2C_2O_4$, хромата калия K_2CrO_4, дихромата калия $K_2Cr_2O_7$, тиосульфата натрия (гипосульфита натрия) $Na_2S_2O_3$, перманганата калия $KMnO_4$, роданида натрия (роданистого натрия) $NaSCN$, роданида калия $KSCN$, роданида аммония NH_4SCN, нитрата серебра (азотнокислого серебра) $AgNO_3$, йода J_2, тетрабората натрия (буры) $Na_2B_4O_7$, хлорида бария $BaCl_2$ и др.

Неиспользованный раствор в мерной колбе тотчас же выливают, а колбу моют. Чистую пришлифованную пробку обертывают чистой фильтровальной или писчей бумагой и закрывают пустую колбу (перед употреблением бумагу снимают).

Если пробка резиновая, а приготовленный точный раствор (например, йода) может оказывать химическое действие на резину, пробку лучше обернуть полиэтиленовой или тефлоновой пленкой. При длительном хранении растворов в стеклянной посуде растворимые части стекла переходят в раствор и реакция последнего меняется. Чтобы избежать этого, стеклянную посуду предварительно выщелачивают длительным пропусканием пара.

При особо точных и ответственных анализах необходимо принимать во внимание возможность выщелачивания стекла и применять кварцевую посуду или посуду из стекла, не содержащего определенный элемент. Щелочные растворы нельзя долго хранить в фарфоровой и особенно стеклянной посуде. Если точным раствором приходится пользоваться часто, его готовят большое количество при тщательном перемешивании, оттитровывают и хранят в бутылях, снабженных бюретками. При хранении следят, чтобы в раствор не попадала влага, углекислота, пыль и т. п. С этой целью бутыли снабжают хлоркальциевыми трубками с поглотителями (для кислот трубку заполняют хлоридом кальция или ватой, для щелочей — натронной известью).

При хранении некоторые растворы недостаточно стойки, они могут выделять осадки, изменяться под действием света, кислорода воздуха, примесей, содержащихся в воздухе, и т. д. Поэтому точные растворы периодически проверяют титрованием.

Расчеты при приготовлении молярных растворов. Исходное положение при расчетах на молярность — 1 л одномолярного (1 М) раствора содержит один моль вещества.

Приготовление 0,1 М (моль/л) раствора нитрата серебра. Подсчитывают молекулярную массу (М) $AgNO_3$, она равна 169,875. В 1 л 1 М раствора

$AgNO_3$ содержится 169,875 г $AgNO_3$, а в 1 л 0,1 М — 16,9875 г. Отвешивают 16,9875 г соли и растворяют в мерной колбе объемом 1 л. Чтобы исключить многократные отсыпания и досыпания вещества при взвешивании, навеску берут, близкую к рассчитанной величине, а затем рассчитывают концентрацию раствора. Например, навеска составила 16,9683 г:

$$16{,}9875 \text{ г} - 0{,}1 \text{ М}$$

$$16{,}9683 \text{ г} - x,$$

$$x = \frac{16{,}9683 \cdot 0{,}1}{16{,}9875} = 0{,}09989 \text{ М (моль/л)}.$$

Если нужно приготовить меньше 1 л раствора, делают пересчет. Например, для объема раствора 250 мл:

$$1000 \text{ мл} - 16{,}9875 \text{ г } AgNO_3$$

$$250 \text{ мл} - x,$$

$$x = \frac{250 \cdot 16{,}9875}{1000} = 4{,}2469 \text{ г}.$$

Отвешивают 4,2469 г $AgNO_3$, вносят в мерную колбу на 250 мл и готовят раствор по правилам, приведенным выше.

Расчеты при приготовлении нормальных растворов. Исходное положение при приготовлении растворов с различной нормальной концентрацией — 1 л однонормального (1 н.) раствора содержит 1 г-экв вещества. Расчеты грамм-эквивалентов веществ (кислот, оснований, солей) в обменных реакциях проводят по вышеприведенным правилам. Для нахождения эквивалентов веществ в окислительно-восстановительных реакциях учитывают следующее: а) эквивалент окислителя равен его молекулярной массе, деленной на число электронов, принятых одной молекулой окислителя в данной реакции; б) эквивалент восстановителя равен его молекулярной массе, деленной на число электронов, отданных одной молекулой восстановителя в данной реакции. Так, для реакции взаимодействия тиосульфата натрия с йодом

$$2Na_2S_2O_3 + J_2 = Na_2S_4O_6 + 2NaJ;$$

$$J_2 + 2\bar{e} = 2J^-;$$

$$2S_2O_3^{2-} - 2\bar{e} = S_4O_6^{2-}$$

эквивалент йода равен:

$$Э_{J_2} = \frac{M}{2} = \frac{253{,}808}{2} = 126{,}904,$$

а эквивалент тиосульфата натрия:

$$Э_{Na_2S_2O_3} = \frac{M}{1} = 135{,}118.$$

Грамм-эквивалент йода равен 126,904 г, тиосульфата натрия — 135,118 г.

Если окислитель (или восстановитель) ведет себя различно в разных реакциях, его эквивалент будет переменным. Например, перманганат калия $KMnO_4$ в зависимости от среды восстанавливается по-разному (табл. 1).

Приготовление раствора нормальной концентрации из кристаллического вещества. Например, нужно приготовить 250 мл 0,1 н. (0,05 моль/л) раствора $K_2Cr_2O_7$ из кристаллического дихромата калия. Грамм-эквивалент рассчитывается с учетом, что в окислительно-восстановительных реакциях хром VI переходит в хром III и молекула $K_2Cr_2O_7$ принимает 6 электронов:

$$\text{Эквивалент}_{K_2Cr_2O_7} = \frac{M}{6} = \frac{294{,}22}{6} = 49{,}04 \text{ г}.$$

1. Эквивалент $KMnO_4$ в зависимости от среды

Окислитель	Среда	Продукт восстановления окислителя	Число электронов, принятых одной молекулой окислителя	Эквивалент окислителя
$KMnO_4$	Кислая	Соль марганца: $MnSO_4$, $MnCl_2$, $Mn(NO_3)_2$	$5\ e^-$	$Э = \frac{M}{5}$
$KMnO_4$	Нейтральная	MnO_2	$3\ e^-$	$Э = \frac{M}{3}$
$KMnO_4$	Щелочная	K_2MnO_4	$1\ e^-$	$Э = \frac{M}{1}$

1 л 1 н. раствора содержит 49,04 г $K_2Cr_2O_7$, 1 л 0,1 н. раствора — 49,04 0,1, а 0,25 л 0,1 н. раствора — $49{,}04 \cdot 0{,}1 \cdot 0{,}25 = 1{,}226$ г. 1,226 г $K_2Cr_2O_7$ отвешивают (на аналитических весах), растворяют в мерной колбе на 250 мл с дистиллированной водой, доводят объем до метки и тщательно перемешивают.

Следует иметь в виду, что многие кристаллические вещества представляют собой кристаллогидраты. В этом случае эквивалент рассчитывают с учетом кристаллизационной воды. Например, для щавелевой кислоты, которая в окислительно-восстановительных реакциях окисляется до CO_2 $\left(H_2C_2O_4 \xrightarrow{-2e} 2CO_2 + 2H^+\right)$:

$$Э_{H_2C_2O_4 \cdot 2H_2O} = \frac{M}{2} = \frac{126{,}070}{2} = 63{,}033.$$

Приготовление растворов нормальной концентрации из концентрированных растворов. Следует приготовить 0,1 н. (0,05 моль/л) раствор H_2SO_4 из концентрированной кислоты, имеющейся в лаборатории. Проведем расчет для 1 л 0,1 н. раствора H_2SO_4.

Ареометром измеряют плотность концентрированной H_2SO_4. Для этого кислоту наливают в высокий стеклянный цилиндр и подбирают соответствующий ареометр, с тем чтобы он плавал в кислоте, не касаясь дна и стенок цилиндра. Деление на шкале ареометра, против которого устанавливается верхний край мениска кислоты, соответствует значению плотности раствора в г/см^3 (кг/м^3). (После применения ареометр обмывают водой, обтирают и убирают в футляр.) По справочным таблицам (приложение 5) находят процентную концентрацию раствора. Например, оказалось, что в растворе содержится 95,6% H_2SO_4, а плотность кислоты 1,84 кг/м^3. Рассчитываем, какое количество концентрированной кислоты необходимо взять для приготовления 1 л 0,1 н. раствора H_2SO_4. Эквивалент H_2SO_4 равен:

$$Э_{H_2SO_4} = \frac{M}{2} = \frac{98{,}078}{2} = 49{,}039;$$

а) 1 л 1 н. раствора содержит 49,039 г H_2SO_4;
1 л 0,1 н. — — $49{,}039 \cdot 0{,}1 = 4{,}9039$ г H_2SO_4;

б) в 100 г раствора содержится 95,6 г H_2SO_4
в x — — 4,9039 г H_2SO_4,

$$x = \frac{100 \cdot 4{,}9039}{95{,}6} = 5{,}1296 \text{ г};$$

в) объем раствора равен $\frac{5{,}1296}{1{,}84} = 2{,}79$ мл.

Отмерив из бюретки (или градуированной пипеткой) 2,8 мл 95,6%-ной серной кислоты в мерную колбу на 1 л, растворяют ее в некотором количестве дистиллированной воды, затем доводят объем до метки и тщательно перемешивают. Полученный раствор сттитровывают раствором щелочи.

Приготовление растворов процентной концентрации из кристаллических веществ. *Пример.* Рассчитать массу воды и сульфита натрия Na_2SO_3 для приготовления 5 л 10%-ного раствора (плотность 1,075 г/см³).

Решение. Масса 5 л полученного раствора составит 5000·1,075=5357 г. В этом растворе должно содержаться 10% вещества.

В 100 г раствора содержится 10 г Na_2SO_3
в 5375 г — — x,

$$x = \frac{5375 \cdot 10}{100} = 537{,}5 \text{ г } Na_2SO_3.$$

Масса воды составит 5000—537,5=4462,5 г. Таким образом, для приготовления заданного раствора необходимо взять 537,5 г Na_2SO_3 и 4462,5 г воды.

Приготовление растворов процентной концентрации разбавлением и смешиванием по правилу «креста» (диагональной схемы).

Пример 1. Рассчитать, в каких соотношениях следует смешать 70%-ный и 10%-ный растворы для приготовления 50%-ного раствора серной кислоты.

Решение. По эмпирическому правилу «креста» искомую концентрацию (50%) пишут в центре пересечения двух диагоналей, концентрации исходных растворов (70% и 10%) — слева. Затем производят вычитание (из большего меньшее) по каждой диагонали (70—50=20 и 50—10=40) и ответы записывают по концам диагоналей справа:

$$\begin{matrix} 70\% & & 40 \\ & 50\% & \\ 10\% & & 20, \end{matrix}$$

Полученные цифры показывают, сколько частей по массе следует взять при смешении исходных растворов (40 частей 70%-ного раствора и 20 частей 10%-ного раствора) для приготовления 50%-ного раствора. Суммарная масса раствора в данном случае составляет 40+20=60 частей (граммов, килограммов, тонн и т. д.). Если нужно приготовить определенное количество раствора, например 500 г, делают расчет по пропорциям:

в 60 г раствора (50 %-ного) содержится 40 г (70 %-ного)
в 500 г — — — x,

$$x = \frac{500 \cdot 40}{60} = 333 \text{ г};$$

в 60 г раствора (50 %-ного) содержится 20 г (10 %-ного)
в 500 г — — — x,

$$x = \frac{500 \cdot 20}{60} = 167 \text{ г}$$

(вторую пропорцию можно заменить вычитанием: 500—333=167 г). Если известны плотности исходных растворов, рассчитывают их объемы. Так, плотность 70%-ной H_2SO_4 равна 1,61 г/см³, 10%-ной — 1,068. Тогда $\frac{333}{1{,}61} = 206{,}8$ мл, $\frac{167}{1{,}068} = 156{,}1$ мл.

Итак, в данном примере при смешении 206,8 мл 70%-ного раствора и 156,1 мл 10%-ного раствора H_2SO_4 получится 500 г 50%-ной серной кислоты. Воду можно рассматривать как раствор с нулевой концентрацией вещества и применять правило «креста» для расчетов по разбавлению растворов.

Пример 2. Какие объемы 96%-ной серной кислоты (плотностью 1,84 г/см³) и воды нужно взять для приготовления 100 мл 30%-ной H_2SO_4 (плотностью 1,22 г/см³)?

Решение. Составляем диагональную схему:

$$\begin{matrix} 96\% \\ 0\% \end{matrix} \Big\rangle 30\ \% \Big\langle \begin{matrix} 30 \\ 66. \end{matrix}$$

Следует смешать 30 г 96%-ного раствора H_2SO_4 и 66 г воды; получим 30+66=96 г заданного 30%-ного раствора H_2SO_4. Находим массу 100 мл заданного 30%-ного раствора: 100·1,22=122 г. Рассчитываем количество исходного раствора и воды для получения 122 г заданного раствора:

96 г — 30 г 96 г — 66 г

122 г — x, 122 г — x,

$$x = \frac{122 \cdot 30}{96} = 36,12; \qquad x = \frac{122 \cdot 66}{96} = 80,4.$$

Находим объемы: $\frac{36,12}{1,84} = 19,6$ мл, плотность воды равна 1 г/см³. Итак, нужно смешать 19,6 мл 96%-ного раствора H_2SO_4 и 80,4 мл воды для получения 100 мл 30%-ного раствора кислоты.

Пример 3. Какой объем воды нужно прибавить к 200 мл 30%-ного раствора NaOH (плотностью 1,33 г/см³) для получения 10%-ного раствора щелочи?

Решение. Составляем диагональную схему:

$$\begin{matrix} 30 \\ 0 \end{matrix} \Big\rangle 10 \Big\langle \begin{matrix} 10 \\ 20. \end{matrix}$$

При смешении 10 г 30%-ного раствора NaOH и 20 г воды получится 10%-ный раствор. В нашей задаче дано определенное количество 30%-ного раствора — 200 мл. Находим массу 200 мл 30%-ного раствора, она равна 200×1,33=266 г. Рассчитываем, сколько граммов воды должно быть в заданном 10%-ном растворе на 266 г 30%-ного раствора:

на 10 г раствора (30%-ного) приходится 20 г воды

на 266 г — — — x,

$$x = \frac{266 \cdot 20}{10} = 532 \text{ г}.$$

Разбавление и смешивание растворов процентной концентрации с применением формул. *Разбавление раствора.* Пусть a — количество раствора (по массе), m — его концентрация (в %); раствор нужно разбавить до концентрации n (в %) объемом воды V (в мл), при этом количество разбавленного раствора составит x (по массе):

$$x = \frac{am}{n}$$

$$V = a\left(\frac{m}{n} - 1\right).$$

Объем воды, равный V, приливают к количеству первоначального раствора, равному a.

Смешивание растворов. Пусть имеется количество раствора a (по массе) с концентрацией m (в %) и раствор того же вещества с концентрацией l (в %);

необходимо получить раствор с концентрацией n (также в %). Количество x (по массе) второго раствора будет равно:

$$x = \frac{l\,(n - m)}{1 - n}.$$

Это количество смешивают с количеством a первого раствора.

Титрование растворов. Для установления точной концентрации приготовленных рабочих растворов их титруют. Это одна из особо ответственных операций лабораторной техники. От правильности приготовления титрованных рабочих растворов зависят результаты анализа в целом. Для титрования необходимо иметь раствор исходного или стандартного вещества с точно известной концентрацией. При этом стандартные вещества должны быть химически чистыми, устойчивыми при хранении как в твердом состоянии, так и в растворе, строго соответствовать химической формуле. Например, щавелевая кислота может быть путем перекристаллизации получена химически чистой, строго отвечающей своей формуле $H_2C_2O_4 \cdot 2H_2O$. Концентрацию ее раствора вычисляют, зная навеску и объем раствора. По стандартному раствору щавелевой кислоты титрованием устанавливают концентрацию рабочего раствора NaOH.

В аналитической практике для многих веществ установлены стандартные вещества, по которым обычно определяют их титр. Для подбора стандартных веществ пользуются руководствами по аналитической химии. Для определения концентрации рабочего раствора отбирают пипеткой отдельные порции раствора (аликвотную часть), титруют их, берут среднее значение из повторных титрований и рассчитывают концентрацию рабочего раствора по формуле:

$$H_1V_1 = H_2V_2, \quad \text{отсюда} \quad H_1 = \frac{H_2V_2}{V_1},$$

где H_2 и V_2 — нормальность и объем стандартного раствора; V_1 — объем рабочего раствора, взятый на титрование (по пипетке или по бюретке, в зависимости от того, что заливают в бюретку — рабочий или стандартный раствор).

Раствор из бюретки приливают небольшими порциями при постоянном перемешивании содержимого колбы. Перед тем как дойти до точки эквивалентности, раствор из бюретки приливают по каплям. При повторном титровании скорость добавления раствора из бюретки не должна изменяться.

Сущность происходящих при титровании химических реакций, выбор индикатора, условия проведения реакции, порядок титрования описаны в соответствующих руководствах. Методы химического анализа в применении к биологическим объектам постоянно совершенствуются. Методики публикуются. В настоящее время в лабораториях широко используют автоматическое титрование.

В расчетах по результатам титрования в объемном анализе важно усвоить понятие «титр раствора по определяемому веществу». Титр раствора, как уже говорилось, показывает содержание вещества (г) в 1 мл раствора и связан с нормальностью этого раствора соотношением:

$$T = \frac{н.\,Э}{1000}.$$

Например, титр 0,1 н. раствора HCl равен:

$$T_{HCl} = \frac{н_{HCl} \cdot Э_{HCl}}{1000} = \frac{0{,}1 \cdot 36{,}5}{1000} = 0{,}00365 \text{ (г HCl в 1 мл раствора HCl)}.$$

Если рабочим раствором HCl необходимо проводить неоднократные определения какого-либо вещества, например NaOH, рассчитывают титр раствора HCl по определяемому веществу NaOH, с которым будет происходить реакция при титровании. В таком случае в формулу для расчета титра войдет грамм-эквивалент того вещества (NaOH), с которым реагирует рабочий раствор (HCl). Ответ получают в граммах определяемого вещества, которые реагируют с 1 мл рабочего раствора:

$$T_{HCl/NaOH} = \frac{{}^{н}HCl \cdot Э_{NaOH}}{1000}$$ (г NaOH, вступающих в реакцию с 1 мл раствора HCl данной нормальности).

Титр раствора по определяемому веществу облегчает расчеты при анализе, так как достаточно умножить данный титр на объем рабочего раствора, пошедший на титрование, чтобы узнать количество граммов нужного вещества, содержавшегося в анализируемой порции. Например, если в приведенном случае при титровании какого-либо раствора NaOH израсходовано 15 мл 0,1 н. рабочего раствора HCl, то количество щелочи (Q) равно:

$$Q_{NaOH} = T_{HCl/NaOH} V_{HCl} = 0{,}00365 \cdot 15 = 0{,}05475 \text{ г.}$$

В таблице 2 приведены примеры приготовления индикаторов для кислотно-основного титрования.

2. Приготовление индикаторов

Индикатор	Область перехода (интервал pH)	Окраска		Способы приготовления
		кислотной формы	щелочной формы	
Метиловый оранжевый, 0,1%-ный раствор	3,1 — 4,4	Розовая	Оранжево-желтая	0,1 г индикатора растворяют в 100 мл воды
Метиловый красный, 0,1%-ный раствор	4,4 — 6,2	Красная	Желтая	0,1 г индикатора растворяют в 100 мл этилового спирта
Лакмус (азолитмин), 0,5%-ный раствор	5,0 — 8,0	—	Синяя	0,5 г индикатора растворяют в 100 мл воды
Фенолфталеин, 0,1%-ный раствор	8,0 — 10,0	Бесцветная	Красная	0,1 г индикатора растворяют в 100 мл этилового спирта
Феноловый красный, 0,1%-ный раствор	6,8 — 8,0	Желтая	—	0,1 г индикатора растворяют в 100 мл 25%-ного этилового спирта
Тимолфталеин, 0,5%-ный раствор	9,3 — 10,5	Бесцветная	Синяя	0,5 г индикатора растворяют в 100 мл этилового спирта
Универсальный индикатор (по Кольтгофу)*	2,0 — 10,0	—	—	Смешивают 0,1 %-ные спиртовые растворы индикаторов: диметиламиноазобензол 15 мл, бромтимол синий 20 мл, метиловый красный 5 мл, фенолфталеин 20 мл, тимолфталеин 20 мл

* Универсальный индикатор имеет окраски: при pH 2 (и меньше) — красно-розовую, при pH 3 — красно-оранжевую, при pH 4 — оранжевую, при pH 5 — желто-оранжевую, при pH 6 — лимонно-желтую, при pH 7 — желто-зеленую, при pH 8 — зеленую, при pH 9 — сине-зеленую, при pH 10 (и выше) — фиолетовую.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ БУФЕРНЫХ СМЕСЕЙ, КОЛОНОК, СИЛИКАГЕЛЬНЫХ ПЛАСТИНОК

Растворы большинства чистых химических веществ имеют неустойчивый pH, который изменяется при добавлении кислот и щелочей. Многие биохимические анализы требуют выполнения реакций в условиях определенного интервала pH, мало изменяющегося при внесении небольших количеств кислоты или щелочи. Для этой цели применяют буферные растворы, представляющие собой смеси слабых кислот с солями этих кислот или смеси слабых оснований с солями слабых оснований; буферным действием могут обладать смеси кислых солей разной основности, например $NaH_2PO_4+Na_2HPO_4$, где первая соль играет роль слабой кислоты, а вторая — ее соли.

Способность раствора противостоять прибавлению кислоты или щелочи называется его буферной емкостью. Выражается она числом грамм-эквивалентов кислоты или щелочи, которые нужно прибавить к 1 мл раствора, чтобы его pH изменился на единицу. Для большинства буферных смесей интервал pH, в котором они обладают достаточным буферным действием, не превышает 2 единиц pH. Чтобы расширить этот интервал, пользуются буферными смесями, состоящими из нескольких слабых кислот и их солей, подобранных с таким расчетом, чтобы там, где кончается область буферного действия одной из них, начиналась область другой. Такие буферные смеси называются универсальными.

Буферные растворы готовят согласно разработанным рецептам. Исходные растворы для буферных смесей приготавливают особенно тщательно. Так, раствор NaOH не должен содержать соды; для этого 100 г химически чистого NaOH растворяют в 120 мл воды и сливают в цилиндр, плотно закрытый резиновой пробкой; в таком концентрированном растворе сода не растворяется и выпадает в осадок. Затем раствор осторожно декантируют и разводят до требуемой концентрации.

Буферные растворы готовят на дистиллированной воде, из которой при кипячении (в течение 30—45 мин) удален CO_2 и хранят в сосудах с хлоркальциевой трубкой для предохранения от доступа CO_2 из воздуха.

Использование сефадекса в гель-фильтрации. В ветеринарных лабораториях широко используют методы хроматографии. Для разделения и фракционирования метаболитов получил распространение метод фильтрования растворов через гель, названный «сефадекс» (Швеция) — гель-фильтрация. Сефадекс имеет вид мелких зерен, набухающих в воде. Например, для разделения полисахаридов с различной молекулярной массой рекомендуют следующие типы сефадекса.

Тип сефадекса	Молекулярная масса разделяемых полисахаридов
G — 25, мелкий	100—5 000
G — 50, грубый	500—10 000
G — 75 »	1000—50 000
G — 100 »	5000—100 000
G — 200 »	5000—200 000

Для белковых веществ диапазоны молекулярных масс шире, чем у полисахаридов.

Для использования сефадекса служит хроматографическая колонка из боросиликатного стекла с рубашкой. Вначале сефадекс смешивают с водой, полученную смесь взмучивают, вливают в колонку и дают осесть. Затем в колонку добавляют концентрированный раствор исследуемого вещества так, чтобы не взмучивался верхний слой сефадекса. Равновесие устанавливается быстро, скорость вымывания значительно выше по сравнению с обычными ионитами. Фракции контролируют спектрофотометрически или по электропроводности.

Приготовление силикагеля и пластинок для метода тонкослойной хроматографии (ТСХ). Метод тонкослойной хроматографии имеет ряд преимуществ перед другими методами хроматографического анализа (колоночной хроматографии и хроматографии на бумаге). Методом ТСХ вещества разделяются быстро — от нескольких минут до 2—3 ч; можно разделять малые количества веще-

ства (0,1—0,05 мкг), а также выделять их препаративно (от 100 до 500 мг). Основан метод на сорбции растворенных веществ адсорбентом; при движении растворителя с разделяемой смесью веществ по неподвижной фазе — адсорбенту разделяемые компоненты перемещаются с различной скоростью в направлении движения растворителя. В качестве сорбентов применяют целлюлозу, Al_2O_3, кизельгур и др. Наибольшее применение получил силикагель — соединение общей формулы $SiO_2 \cdot nH_2O$.

Адсорбционные свойства силикагеля могут быть существенно изменены добавлением кислот, оснований, солей. Силикагель, пропитанный 100%-ным раствором сульфата аммония, используют для разделения липидов и фосфолипидов, обработанный фосфатным буфером — для разделения аминокислот; силикагель, импрегнированный нитратом серебра, позволяет разделять отдельные молекулярные типы фосфолипидов в зависимости от степени ненасыщенности образующих их жирных кислот.

Для разделения липидов на отдельные фракции применяют марки силикагеля: G, H, DC, L, КСК гранулированный и др.

Подготовка силикагеля марки КСК. При отсутствии специально предназначенных для тонкослойной хроматографии силикагелей рекомендуют продажный гранулированный или кусковой силикагель марки КСК или ШСК. Для этого кусковой силикагель измельчают на шаровой мельнице и пропускают с водой через сито. Через 30 мин воду удаляют декантацией, а осадок промывают сначала горячей водой, затем горячим этанолом, опять водой и концентрированной соляной кислотой до приобретения фильтратом светло-желтой окраски. Отмывают водой до отрицательной реакции на ионы хлора (помутнение 1—0,1%-ного раствора азотнокислого серебра). Проверку на ионы железа проводят с роданистым аммонием (калием, натрием). Отмытый силикагель сушат при 120—130° в течение 5—6 ч и просеивают через сита с размером ячеек 150—200 мкм. Хранят в банках с притертыми пробками.

Приготовление ТСХ-пластинок с закрепленным слоем сорбента. При отсутствии в лаборатории специального аппликатора для нанесения слоя сорбента на хроматографические пластинки последние можно изготовить следующим образом. Просеянный через сито 150—200 мкм силикагель тщательно перемешивают с 6% (по массе) чистого медицинского гипса или 1% растворимого крахмала и наносят смесь на поверхность матированных с помощью наждачного порошка обезжиренных стеклянных фотопластинок (удобны 13×18 см). Толщина слоя сорбента, образуемого на пластинке, обеспечивается при разравнивании его стеклянной трубкой (диаметр 1,5—2 см), на которую на расстоянии 12 см друг от друга наматывают по нескольку витков проволоки диаметром 0,5 мм. Такие кольца служат ограничителями размера наносимого слоя, а также гарантируют его постоянную толщину (0,5 мм). Пластинки с нанесенным слоем сорбента размещают на строго горизонтальной поверхности и опрыскивают из пульверизатора дистиллированной водой до полного насыщения слоя. После подсушивания на воздухе (избегать пыли) пластинки помещают в сушильный шкаф и активируют при 105—110° в течение часа или при 140° в течение получаса. Приготовленные таким образом пластинки хранят в эксикаторах над поглотителем (хлористый кальций). При длительном хранении пластинок их активность следует периодически проверять.

Если пластинки готовят для экспресс-метода, сорбент можно наносить на пластинку в виде жидкой взвеси силикагеля с гипсом или крахмалом в воде с помощью пипетки. Более или менее однородные по своим свойствам пластинки получают при нанесении одинаковых объемов такой взвеси на каждую пластинку. Отклонения от рекомендованных марок силикагелей и режимов их обработки допускаются в исключительных случаях.

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С РЕАКТИВАМИ, ПРАВИЛА ИХ ХРАНЕНИЯ

При работе в лаборатории особое внимание обращают на технику безопасности. При несоблюдении элементарных правил техники безопасности лабораторных работ, незнании свойств материалов, с которыми приходится иметь дело,

неумелом обращении с реактивами и приборами могут происходить травмы. При работе необходимо придерживаться общих правил:

в лаборатории следует соблюдать чистоту и порядок;

изучить по справочникам используемые в лаборатории вещества, обращая особое внимание на огнеопасность, ядовитость, возможность образования взрывчатых смесей с другими веществами;

анализы, связанные с применением концентрированных кислот и щелочей, а также с выделением вредных, ядовитых, огнеопасных газов, паров, с образованием мелких кусочков веществ, с разбрызгиванием жидкости, надо выполнять в вытяжном шкафу, а в некоторых случаях — в защитных очках, фартуках и нарукавниках;

работу с легковоспламеняющимися и взрывоопасными веществами (бензин, бензол, сероуглерод, ацетон, диэтиловый эфир и др.) проводить в вытяжном шкафу, вдали от огня и включенных нагревательных приборов (если нужно использовать водяную баню, то ее предварительно нагревают в другом месте, применяют также электроплитку со скрытыми нагревательными элементами); хранить их в толстостенных склянках, железных ящиках, выложенных асбестом; общий запас огнеопасных жидкостей в рабочем помещении лаборатории не должен превышать 2—3 л;

концентрированные и ядовитые жидкости не набирать в пипетку ртом, а пользоваться резиновой грушей или пипеткой с баллоном; при переливании их из больших бутылей в меньшие сосуды применять сифоны;

не бросать в раковину бумагу, твердые вещества, не выливать в нее остатки кислот, щелочей, огнеопасных и сильнопахнущих жидкостей; собирать их в специальные толстостенные, плотнозакрывающиеся склянки;

не нагревать закупоренные сосуды и аппараты, кроме специально для этого предназначенных;

соблюдать особую осторожность при работе со сжатыми газами (водородом, кислородом, хлором, метаном, ацетиленом, аммиаком и др.); предохранять баллоны от падения, ударов, толчков, нагревания; перекатывать баллоны осторожно, вручную, в наклонном положении;

при работе с вакуумом надевать защитные очки; при проведении работ в вакууме не применять плоскодонных колб — они будут раздавлены;

все химические реактивы хранить только в соответствующей посуде с этикетками и ясными надписями, а разлагающиеся на свету реактивы ($AgNO_3$ и др.) — в темной посуде;

соблюдать крайнюю осторожность при вскрытии склянок с реактивами, остерегаться повреждения склянок; если притертая стеклянная пробка сидит плотно, то горлышко сосуда обертывают смоченным горячей водой полотенцем и осторожно постукивают по верхней части пробки деревянным предметом, извлекая ее; можно склянку перевернуть вверх дном и опустить горлышком в сосуд с водой или разбавленной соляной кислотой; стеклянные краны, которые «заедает», открывают теми же приемами или отмачивают несколько часов в 5%-ном мыльном растворе.

Работа с кислотами и щелочами. Концентрированные растворы кислот и щелочей для постоянного пользования нужно держать в небольших бутылях и склянках емкостью 1—2 л. Под такую посуду подкладывают кусок стекла или подставку из пластмассы, стойкой к кислотам и щелочам.

При разбавлении кислот, особенно серной и азотной, нужно добавлять *кислоту к воде*, иначе произойдет вскипание воды и разбрызгивание кислоты.

При переливании дымящих кислот, таких как концентрированная соляная или дымящая азотная, надевают противогаз, респиратор или обвязывают рот и нос полотенцем, смоченным в растворе соды. Применение предохранительных очков при этом обязательно. Работу лучше проводить под тягой.

Если кислота прольется на пол, ее тут же засыпают песком, собирают его и выносят из помещения. Облитое место обмывают раствором соды или аммиака.

Большие бутыли с кислотами и щелочами лучше хранить в стояках, тогда облегчается переливание из них и достигается большая безопасность. Большие бутыли с кислотами, щелочами и другими агрессивными жидкостями хранят только в плетеных корзинах. Эти бутыли нельзя ставить прямо на пол, особен-

но каменный. На каждой бутыли должна быть этикетка; иногда к горлышку бутыли (или к корзине) прикрепляют фанерную дощечку с надписью о содержимом. Работу с большими бутылями (переноска, переливание и др.) нельзя выполнять одному.

Очень осторожного обращения требуют щелочи — едкий натр, едкое кали, концентрированные растворы аммиака. Куски твердой щелочи нельзя брать руками, нужно надевать резиновые перчатки или пользоваться тигельными щипцами, которые после употребления тщательно обмывают. При разбавлении кусковой щелочи надевают резиновые перчатки и предохранительные очки. Взвешивают твердые щелочи в стеклянной или фарфоровой таре.

Растворение NaOH и KOH в воде вызывает сильное разогревание, поэтому щелочи растворяют не в стеклянной посуде, а в фарфоровых стаканах или чашках. Сначала готовят концентрированные растворы (32—40%, плотностью 1,35—1,45 г/см^3), дают им отстояться (иногда несколько дней), затем раствор с осадка осторожно при помощи сифона переливают в другую посуду.

Хранят растворы щелочей и твердые щелочи в хорошо закрытой посуде, бутыли со щелочами нельзя закрывать стеклянными притертыми пробками.

Концентрированные растворы щелочей сильно выщелачивают стекло бутылей, поэтому внутреннюю часть бутыли рекомендуют покрыть парафином (или смесью церезина и вазелина, или сплавом парафина с полиэтиленом). Для этого несколько кусков парафина помещают внутрь бутыли и нагревают ее в сушильном шкафу или над электрической плитой (осторожно) до 60—80°. Когда парафин расплавится, бутыль поворачивают и распределяют разогретую массу тонким слоем по всей внутренней поверхности.

Работа с концентрированным раствором аммиака требует большого внимания и осторожности. Поступает он в лаборатории в виде 25%-ного водного раствора. Переливать его из крупных бутылей в мелкие нужно обязательно в противогазе, на открытом воздухе или под тягой.

ПОМОЩЬ ПРИ ОЖОГАХ И ОТРАВЛЕНИИ

При ожогах огнем делают длительную примочку раствором перманганата калия или этиловым спиртом, а затем обожженное место покрывают специальной эмульсией. При ожогах кислотами кожи или глаз обожженное место промывают большим количеством воды, а затем разбавленным раствором гидрокарбоната натрия $NaHCO_3$. При ожогах едкими щелочами пораженное место хорошо обмывают проточной водой, затем 1%-ной уксусной кислотой; особенно опасны щелочи для роговицы глаза. При работе с твердыми щелочами обязательно надевают очки. Если на кожу попадет разъедающее органическое вещество, смывать водой его бесполезно, нужно быстро промыть в большом количестве органическим растворителем (спиртом, бензолом); причем избегают образования на коже концентрированных растворов.

В случае отравления хлором или парами брома следует длительно вдыхать спирт, затем выйти на свежий воздух.

При сильных ранениях, ожогах и отравлениях после оказания первой помощи пострадавшего немедленно направляют в поликлинику.

Медикаменты и перевязочные средства всегда должны находиться в лабораторной аптечке. Растворы гидрокарбоната натрия, аммиака и уксусной кислоты нужно держать на каждом рабочем столе.

Источники: 2, 5, 29, 68, 77, 91, 95.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРИБОРОВ И ЛАБОРАТОРНОГО ОБОРУДОВАНИЯ

ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ РАБОТЫ ЭЛЕКТРОИЗМЕРИТЕЛЬНЫХ ПРИБОРОВ

По принципу работы приборы, используемые при изучении состава и свойств вещества, бывают оптико-аналитические и электрохимические.

Оптико-аналитическими приборами измеряют и регистрируют величину взаимодействия оптического излучения с анализируемой средой или свойства оптического излучения изучаемой среды. Оптическими называются излучения ультрафиолетовой (длина волны от 200 до 400 нм), видимой (400—800 нм) и инфракрасной (800—3000 нм) областей спектра. Чаще приборы такого типа (абсорбциометры, колориметры, турбидиметры и нефелометры) применяют для анализа состава и свойств жидкостей. Все эти приборы высокочувствительны и высокопроизводительны, с их помощью можно контролировать объективность показания. Устроены они по идентичной схеме. Работают на принципе измерения относительного ослабления оптического излучения в результате взаимодействия света с анализируемым веществом.

Метод абсорбциометрии основан на измерении величины поглощения оптического излучения при прохождении его через анализируемое вещество, например через прозрачный раствор. Методы турбидиметрии и нефелометрии базируются на изменении оптического излучения при прохождении через непрозрачные растворы, имеющие нерастворимые частицы — взвеси. Турбидиметрический метод используют для измерения меняющегося потока излучения вследствие поглощения и рассеивания его раствором, а нефелометрический — для измерения ослабления оптического излучения вследствие его рассеивания частицами взвеси в растворе.

Конструктивная особенность приборов заключается в том, что при абсорбциометрии и турбидиметрии источник света, измеряемый раствор и фотоэлемент (приемник света) находятся на одной оси, то есть исследуется величина проходящего света. В нефелометрических приборах измеряется отраженный рассеянный свет, так как приемник света находится под углом 90° к излучателю. Абсорбциометрические приборы, работающие в видимой части спектра, называются колориметрами или колориметрическими анализаторами.

При фотометрировании цветных растворов в определенном диапазоне их плотности концентрация поглощающего излучение вещества и относительное ослабление потока излучения, прошедшего через раствор, имеют пропорциональную зависимость, то есть оптическая плотность раствора (Д) прямо пропорциональна концентрации растворенного вещества.

В результате преобразования светового потока после его прохождения через раствор в электрический импульс установлено, что оптическая плотность раствора равна логарифму отношения интенсивности потока излучения, вошедшего в раствор, к интенсивности потока излучения, вышедшего из раствора, или равна логарифму отношения соответствующих электрических сигналов, полученных в результате преобразования оптических сигналов. Это отношение, выраженное в процентах, получило название пропускания. Таким образом, эти приборы имеют две шкалы: линейную шкалу пропускания (Т) и логарифмическую шкалу оптических плотностей (Д).

Специализированные приборы могут иметь градуировку в единицах исследуемого вещества, например в концентрациях гемоглобина, холестерина, билирубина и т. д.

В связи с тем что взаимодействие оптического излучения с анализируемой средой и способы использования излучения различные, лабораторные приборы бывают следующих разновидностей: абсорбционнометрические, турбидиметрические, нефелометрические, пламенно-фотометрические, рефрактометрические, поляриметрические, атомно-абсорбционные и люминесцентные оптические анализаторы.

Широко применяют приборы для сочетанного физико-химического метода анализа, например универсальные спектрофотометры, в которых, кроме абсорбционной спектрофотометрии, предусмотрена возможность применения других оптических методов. В каждой биохимической методике, основанной на использовании оптических методов физико-химического анализа, указывается спектральная характеристика излучения, при которой проводится измерение.

Возможность выделения определенного участка спектра излучения технически в приборах может быть решена по-разному: применением интерференционных узкополосных (10—30 нм) и широкополосных светофильтров, специальных источников излучения и специальных устройств, называемых монохроматорами. Последние дают возможность получить излучения в очень узком (1 нм) диапазоне длин волн. Анализаторы с монохроматорами называются спектрофотометрами. Многие спектрофотометры имеют устройства, с помощью которых можно графически зарегистрировать кинетику биохимических процессов в исследуемой среде или получить кривую поглощения света в широком диапазоне длин волн.

Промышленность многих стран выпускает автоматические анализаторы, где наибольшее количество измерений проводится с помощью абсорбциометрических устройств. Современные автоматические установки выполняют весь комплекс работ: от дозированного введения проб анализируемого субстрата и необходимых реагентов до выдачи конечного результата в виде специального бланка, цифровой или графической информации по 20—30 показателям и более. Все перечисленные приборы градуированы в процентах пропускания (Т) и единицах оптической плотности (Д). Колориметр КФМЦ-2 имеет диапазон от 0,05 до 1,5 Д. На нефелометре НФМ имеется 5 диапазонов: от 1 до 100%, Т. У большинства приборов градуировка диапазонов от 0 до 100% Т и от 1,3 до 0 Д.

Принципиальная схема устройства всех фотометрических приборов включает источник излучения, устройство, формирующее длину волны излучения (фильтры, монохроматоры), интенсивность светового потока (диафрагмы), форму и пространственное расположение светового потока (линзы, зеркала), систему введения анализируемой жидкости в световой поток (кюветы), преобразователь выходного излучения, устройства индикации и регистрации.

Спектрофотометры — оптические анализаторы, с их помощью фотометрический анализ вещества можно проводить на любой выбранной длине волны излучения. Некоторые спектрофотометры имеют специальные приспособления для анализа в поляризованном свете (спектрополяриметры), флуоресцентном свете (спектрофлуориметры, спектролюминографы), приспособления для пламенной фотометрии (пламенные спектрофотометры), атомно-абсорбционной фотометрии (атомно-абсорбционные спектрофотометры) и др.

У большинства спектрофотометров есть плавная ручная или автоматическая установка длины волн, а у приборов, оснащенных графической регистрацией, — плавные автоматические изменения длины волн (СФ-8, СФ-9, СФ-10, СФ-14, СФ-18). В комплекте спектрофотометра СФК-601 имеются сменные флуориметрическая и нефелометрическая приставки. Чувствительность этого прибора в режиме флуориметрирования 1.10^{-9} г/мл концентрации флуоресцеина. В спектрофотометрах применяются различные измерительные устройства в виде стрелочных индикаторов (СФК-601, СФ-26) с ручной компенсацией электрического сигнала (СФ-4А, СФ-16, СФД-2), с автоматической компенсацией оптического или электрического сигнала (СФ-8, СФ-10).

К некоторым спектрофотометрам можно подключить внешнее измерительное или регистрирующее устройство, например к спектрофотометру СФ-26 — цифровые вольтметры типа Щ1212, Щ1413, а к СФК-601 — самописец типа Н-37. В обособленную группу приборов этого типа выделяют микрофотометры или микроспектроколориметры, регистрирующие оптическую плотность микрообъектов. Принципиальная особенность у этих приборов (например, ИФО-451, ФК-101) —

специальное устройство для компенсации световых потоков и столик, на котором закрепляется объект, имеющий микрометрическое перемещение.

Флуориметры (люминометры). Принцип их работы основан на измерении величины светового потока, возникающего вследствие возбуждения некоторых веществ под действием света определенной длины волны (люминесценции). Источник ультрафиолетового света возбуждает флуоресценцию веществ в растворе, которая измеряется фотоэлектрическими устройствами и преобразуется в электрический импульс, пропорциональный величине люминесценции, то есть концентрации исследуемого вещества.

Область применения приборов довольно широкая — от биохимических аналитических исследований (витаминов, гормонов, ферментов и т. д.) до микробиологических (определение концентрации микробов, предварительно покрытых меченными флуоресцеином антителами), и иммунологических.

Поляриметры. Рефрактометры. Приборы этой группы построены на принципе измерения светового потока, поляризованного исследуемым веществом. Многие вещества способны изменять плоскость поляризации поляризованного света, причем угол изменения плоскости поляризации бывает пропорционален концентрации этого вещества. Приборы, работающие на принципе измерения угла поляризации, имеют источник света, поляризатор, пропускающий свет, поляризованный в определенной плоскости, устройство для кювет, содержащих исследуемый раствор, и анализатор — второй поляризационный фильтр, с помощью которого можно измерить угол смещения поляризации в луче света, прошедшем через раствор, по отношению к плоскости исходного луча.

Свет проходит через светофильтр, пропускающий поток определенной длины волны излучения, конденсор, формирующий луч, поляризатор, кварцевую пластинку, кювету с анализируемым веществом, анализатор, объектив и окуляр, освещает шкалу прибора и попадает в глаз исследователя. Регулирующим устройством выравнивается освещенность двух или нескольких полей, наблюдаемых исследователем в объективе. Регулирующее устройство имеет градуировку, по которой определяется угол смещения поляризации и в конечном счете концентрация вещества.

При вращении анализатора в поляриметрах П-161, 817 и СМ две наружные части поля освещаются или затемняются, в зависимости от угла поворота, а средняя часть поля меняет освещенность в обратном порядке. Показания с оптической шкалы регистрируют при положении, когда средняя часть поля одинаково затемняется с крайними, а границы полей исчезают. Определение правовращающих веществ на СМ-2 проводится на шкале от 0 до 35°, а левовращающих — от 360 до 325°, при этом угол вращения определяется как разница между 360° и величиной отсчета по шкале.

Пламенные фотометры. Принцип их работы основан на измерении интенсивности спектрального излучения веществ, введенных в пламя газовой горелки. Для создания пламени чаще всего используют пропан-бутан, ацетилен и природный газ. Исследуемое вещество вводится в пламя горелки в виде аэрозолей.

При определении Ca, Mg, Mn, Pb и других веществ используют пламя ацетиленовых горелок. Приборы оснащены устройствами дозирования и введения исследуемых растворов в пламя горелки, оптической системой, формирующей луч света, падающий на приемник, электронными блоками усиления сигнала, блоками индикации или регистрации, устройствами поджига горелки и т. д. Усиление сигнала происходит либо при постоянном токе (ПФМ, ФП-101, ПАЖ-1), либо при переменном (СФП-1 БИАН-140). В фотометре ФП-101 электрический сигнал формируется устройством таким образом, что его величина становится пропорциональной концентрации исследуемого вещества, и шкала прибора градуирована в единицах концентрации вещества.

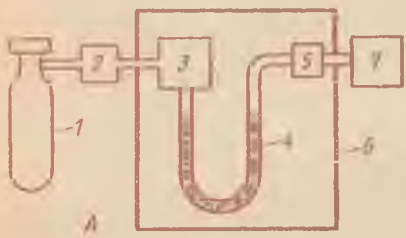
Атомно-абсорбционные спектрофотометры. Принцип их работы основан на измерении величины спектрального поглощения атомами и молекулами исследуемого вещества, находящегося в плазменном состоянии.

В работе приборов используется явление атомной абсорбции определенной длины излучения, проходящего через так называемый атомный пар. Для его получения применяют атомизаторы — устройства, передающие исследуемому веществу порцию энергии, например тепловой, которой достаточно для эмиссии атомов, вследствие чего и образуется атомный пар. Анализаторы имеют горелки

(газовые, твердые электрические нагреватели). Источником излучения света является специальная лампа с полым катодом, выполненным из того же металла, для анализа которого она предназначена. При работе лампа испускает линейчатый спектр, характерный для данного металла. Приборы чрезвычайно чувствительны, но дороги и малодоступны для широкого применения.

Газожидкостные хроматографы. Газожидкостная хроматография, как и газоадсорбционная, — вариант газовой хроматографии — метода разделения летучих веществ, основанного на способности веществ по-разному распределяться между подвижной и неподвижной фазами.

В газовой хроматографии подвижной фазой является газ, неподвижной — жидкость или твердое тело с адсорбционными свойствами. Газожидкостная хроматография основана на использовании в качестве подвижной фазы газа, а неподвижной — жидкости. При газоадсорбционной хроматографии в качестве неподвижной фазы применяют твердые тела. Газожидкостную или распределительную хроматографию рекомендуют как высокочувствительный метод при разделении липидов, в том числе жирных кислот, глицеридов и различных липидов стероидной природы. В сочетании с другими методами — спектрофотометрией, ультрацентрифугированием и т. д. газожидкостная хроматография дает возможность широкого спектра биохимических исследований. Разделение веществ при хроматографическом анализе производится на приборе, называемом газовым хроматографом, схема которого представлена на рисунке 1. Колонку *4* заполняют инертным носителем — измельченным твердым веществом, на который нанесен тонкий слой нелетучей жидкости (жидкая фаза). Смесь, подлежащую хроматографическому разделению, вводят в камеру *3*, которая находится в начале колонки; здесь смесь быстро испаряется и потоком газа-носителя вносится в колонку. При прохождении через колонку компоненты анализируемой смеси распределяются между подвижной и неподвижной фазами в соответствии с их коэффициентами распределения и удерживаются неподвижной жидкой фазой, вследствие чего образуются отдельные зоны веществ в газе-носителе. Зоны последовательно выносятся газом-носителем из колонки и попадают в детектирующее устройство *5*, где тем или иным способом сигнализируют о выходе компонента. Сигнал может быть зарегистрирован самописцем *7*. Записанные сигналы детектора называются хроматограммой и имеют вид апериодической кривой с пиками разной высоты и длительности. Каждый пик характеризует прохождение одного компонента смеси. Время от внесения смеси до выхода ее на-



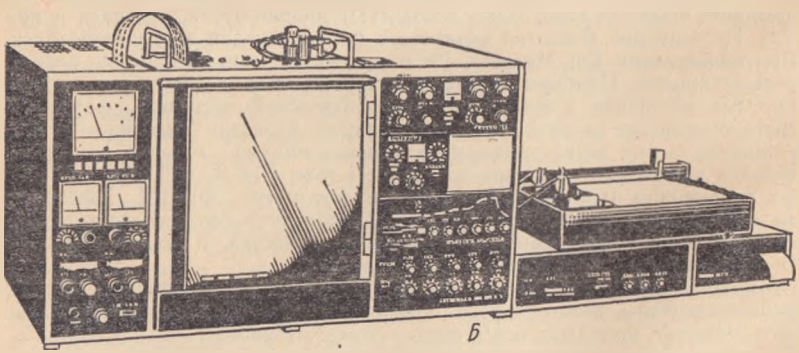


Рис. 1. *А* — схема газового хроматографа:

1 — баллон с газоносителем; *2* — редуктор; *3* — камера ввода пробы; *4* — хроматографическая колонка; *5* — детектор; *6* — термостат; *7* — самописец;
Б — общий вид хроматографа «Хром-5».

вывается временем удержания и зависит от ряда причин, в том числе от температуры, поэтому колонка помещается в термостат *6*.

ОСНОВНЫЕ ПРАВИЛА УСТАНОВКИ И ЭКСПЛУАТАЦИИ ПРИБОРОВ

Лабораторные приборы и оборудование, выпускаемые медицинской промышленностью, разрешаются к применению приказом Министерства здравоохранения СССР (МЗ СССР), а также решением Государственного комитета стандартов СССР (Госстандарт СССР). Импортируемые в СССР приборы должны также получить разрешение МЗ СССР, а сами приборы пройти государственные приемочные (метрологические) испытания. Приборы, прошедшие эти испытания, подлежат государственному или ведомственному метрологическому надзору. Периодический контроль измерительной техники проводится путем проверки их показаний по категориям стандартных образцов. Стандартные и контрольные образцы имеют следующие категории: а) государственные стандартные образцы (ГСО) — утверждаются Госстандартом СССР, регистрируются в государственном реестре средств измерений и служат для работ органов государственной и ведомственной метрологической служб; б) отраслевые образцы (ОСО) — утверждаются ведомственными организациями по согласованию с Госстандартом СССР, применяют их для контроля правильности результатов измерения по всем методикам, кроме методик, регламентированных государственными стандартами, и для градуировки средств измерений; в) стандартные образцы предприятий (СОП) — утверждаются так же, как и ОСО, используют их для работ по стандартам предприятий.

Средства измерений проверяют только представители метрологических организаций. Основным документом при этом является техническая эксплуатационная документация, прилагаемая к прибору. Устанавливают вновь приобретенный прибор представители организации изготовителя, которые проверяют его комплектность по техническим условиям, соответствие внешнему виду и наличие внешних систем индикации, регулировки и контроля. Функциональную способность прибора и метрологическую характеристику выверяют по техническому описанию и стандартным образцам.

Таким образцом для фотоэлектрических абсорбциометров, колориметров, спектрофотометров, у которых метрологическая характеристика выражена в единицах пропускания или оптической плотности, является набор стандартных светофильтров, физическая характеристика которых соответствует значениям принятой градуировки шкал. Для проверки pH-метров имеются стандартные образцы буферных растворов со значениями pH: 1,68; 4,0; 6,88; 9,22. Для рефрактометров и поляриметров используют образцы специальных пластин с градуировкой поляризации, выраженной в угловых градусах. Гемоглобинометры, градуированные гемиглобинцианидным методом, калибруются стандартными растворами гемиглобинцианида в ампулах. Положительные результаты проверки приборов оформляют свидетельством на право дальнейшей его эксплуатации.

Техника безопасности при эксплуатации приборов и оборудования. Технической документацией, прилагаемой к каждому устройству или прибору, предусмотрены необходимые меры и условия эксплуатации, обеспечивающие безопасность обслуживающего прибор персонала, чистоту окружающей среды, исключение электромагнитных помех в работе. При работе с электроизмерительными приборами наибольшую опасность представляют поражения током. Мерами безопасности являются заземление приборов и строгое соблюдение инструкции, прилагаемой к каждому прибору. При эксплуатации установок, предусматривающих применение различных газов, возможную угрозу представляют поражения органов дыхания, создание взрывоопасных смесей, возникновение пожаров.

ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА КРОВИ

В настоящее время промышленность ряда стран выпускает отдельные приборы и комплексные установки для анализа крови человека и животных — авто-

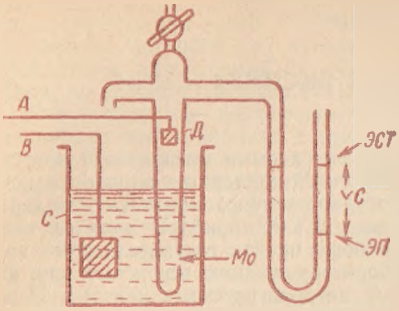


Рис. 2. Принципиальная схема датчика счета частиц:

АВ — электроды измерительной электрической цепи; *С* — сосуд с взвесью частиц (клеток); *Д* — стеклянная полая трубка с электродом; *Мо* — микроотверстие; *Е* — система стеклянных трубок, обеспечивающих вакуум; *ЭП* — электрод начала отсчета; *ЭСТ* — электрод, обеспечивающий конец счета.

матические анализаторы, способные за короткий период (до 3000 анализов в 1 ч) выдавать информацию в виде цифр, графиков, или гистограмм, а также в любой другой форме после введения по заданной программе в ЭВМ о цитологическом, биохимическом составе и физических характеристиках крови. В нашей стране применяют автоанализаторы БИАН и ЦИАНО (СССР), «Конитифло» (Венгрия), ЛКБ (Швеция), «Браун-систематик» фирмы «Оптон» (ФРГ), систему ОЛЛИ-3000 (Финляндия), «Селектив эпелайзер П» (Швейцария), SMA фирмы «Техникон» (США — Ирландия), «Аббат» фирмы «Культер С» (Франция), «Центрифихем» фирмы «Юнион Карбайд» (США) и др.

Многоканальные (12—30) системы автоматических анализаторов в небольших объемах исследуемого образца крови (0,5—2,5 мл) дают возможность провести одновременно количественное определение глюкозы, мочевины, мочевой кислоты, креатинина, билирубина, общего белка, аминотрансферазы, лактатдегидрогеназ, фосфатаз, катионов K^+, Na^+, Ca^{++}, Mg^{++} и др., анионов PO_4^{-3}, Cl^- и др.

В автоматических установках предусмотрены сменные блоки, при помощи которых можно перестроить систему практически на все виды определения ферментов, белков и их фракций, сахаров и минерального состава крови.

Приборы для подсчета количества и размеров клеток крови, или кондуктометрические анализаторы. Они автоматически подсчитывают частицы, взвешенные в электропроводящем растворе (например, клетки крови в физрастворе), в момент прохождения их через отверстие электрода.

Подсчет клеток крови целлоскопами или кондуктометрическими цитометрами типа ЦМК-1 (входящими в гематологический комплекс КГ-2) проводят путем измерения различия электропроводности среды и клеток крови (у последних электропроводность очень малая). При автоматическом подсчете частиц, кроме количества, определяют их размер. Указанные цитометры могут анализировать частицы в диапазоне размеров от 2 до 80 мкм по диаметру и от 5 до $2{,}5 \times 10^5$ мкм^3 по объему.

Принцип работы приборов этого типа основан на измерении и регистрации перепада импеданса (сопротивления) в электрической цепи в момент прохождения частиц (клеток) через калиброванное капиллярное отверстие электрода вместе с засасываемой жидкостью. На рисунке 2 показана принципиальная схема устройства детектирующего прохождения частиц. Величина импульса, появляющегося в электронной схеме, зависит от величины частицы (клетки), прошедшей через капиллярное отверстие электрода. Специальное электронное устройство дает возможность подсчитать число частиц и измерить их величину в определенном объеме. Полученные данные могут быть визуально оценены по величине импульсов на электронно-лучевой трубке, зарегистрированы пересчетными электронно-цифровыми устройствами или чернилопишущими устройствами в виде кривой распределения клеток по их величине. Дозирование объема анализируемой суспензии в приборе ЦМК-1 осуществляется ртутным дозатором с гидравлической системой за счет вакуума, создаваемого перемещением ртути в U-образной трубке *Е*. Время счета частиц определяется моментом замыкания ртутью электродов *ЭП* (начало счета) и *ЭСТ* (конец счета), а объем засасываемой через капилляр жидкости (Uc) равен объему стеклянной трубки между *ЭП* и *ЭСТ*. В приборе ЦМК-2, входящем в гематологический комплекс КГ-1, вакуумирование системы ртутью заменено специальным насосом.

Характеристика цитометра ЦМК-2.

Диапазон измерений:

концентрация эритроцитов, эр/л	от 5×10^{11} до 1×10^{13}
концентрация лейкоцитов, лк/л	от 2×10^{9} до 1×10^{11}
концентрация тромбоцитов, тр/л	от 2×10^{9} до 10×10

Пределы погрешностей относительно измерений концентраций:

эритроцитов, %	±5
лейкоцитов, %	±11
тромбоцитов, %	±10

Время измерений 1 пробы, с:

эритроцитов	30
лейкоцитов	30
тромбоцитов	100

Количество крови, необходимое для анализа, мл	0,02.
Мощность, ВА, потребляемая от сети 220 В, 50 Гц	50.
Масса, кг	20.

Аналогичное устройство и принцип работы у приборов «Культер» (Франция), «Целлоскопы» (Швеция) и др.

Приборы могут иметь ряд дополнительных устройств и приспособлений, имеющих второстепенное значение, — электрические насосы, специальные оптические системы визуального контроля чистоты микроотверстия, через которое просасывается суспензия частиц (клеток), устройство обработки и регистрации результатов и др.

Приготовление растворов для подсчета клеток крови. Физиологический раствор, используемый для разбавления крови, является основным в работе; от его качества и чистоты приготовления зависит достоверность получаемых результатов. Вода для приготовления физраствора должна содержать минимальное количество частиц, размеры которых соизмеримы с клетками крови, так как их прохождение через микроотверстие электрода будет подсчитано прибором. Изотоничность раствора — необходимое условие сохранения целостности клеток крови и их размеров. При повышении осмотического давления растворов, что бывает при повышенной концентрации ионов легкодиссоциирующих солей, клетки крови могут уменьшаться в объеме. При автоматическом подсчете и распределении клеток по их величине получаются искаженные результаты. При понижении осмотического давления раствора часть клеток набухает, увеличиваясь в объеме, а эритроциты лизируются. Особенно чувствительны клетки крови новорожденных животных.

Осмотическая резистентность клеток крови может меняться в зависимости от состояния и возраста животных, поэтому исследования осмотической резистентности эритроцитов целесообразно проводить перед их автоматическим подсчетом. Опасность лизиса эритроцитов и изменения в мембранах лейкоцитов представляют остаточные количества детергентов — поверхностно-активных веществ, применяющихся для мытья лабораторной посуды.

Показатель концентрации водородных ионов (pH) в физрастворе должен быть равен или приближаться к значению pH исследуемой крови. Для крови крупного рогатого скота и новорожденных телят этот показатель находится в пределах 7,38—7,41. Особенно неустойчивы к сдвигам pH эритроциты новорожденных телят. pH ниже 7,0 приводит к изменению объема клеток — набуханию и частичному лизису эритроцитов, увеличению объема некоторых клеток лейкоцитарного ряда; при pH выше 7,41 уменьшается объем клеток.

Минеральные примеси в воде (например, водопроводной) менее опасны, чем деминерализация и перегонка (дистилляция воды), не гарантирующие сохранение клеток. Кроме того, перегонка нередко приводит к значительному закислению воды, причем эта величина непостоянная (зависит от срока хранения воды), что значительно осложняет приготовление стандартного физраствора.

Антикоагулянты, используемые для стабилизации крови при подсчете ее клеток на автоматических приборах, не имеют специфических противопоказаний и применяются в соответствии с изложенным на стр. 213. Однако, в связи с тем что кровь разбавляют большим количеством физраствора, который может быть приготовлен на жесткой водопроводной воде, использование оксалатов приводит к образованию нерастворимых частиц (соединений оксалатов с известью), что, в свою очередь, искажает результат подсчета. Поэтому рекомендуют пользоваться 20%-ным раствором ЭДТА-3 (трилон Б); им же обрабатывают пробирки для взятия крови. Раствор готовят на дистиллированной воде, наливают в пробирку, после ее ополаскивания выливают в следующую и т. д. Оставшийся на стенках раствор трилона Б высушивают (в сушильном шкафу). Кристаллический осадок ЭДТА-3 на стенках пробирки растворяется первыми порциями крови и надежно предохраняет ее от свертывания в течение 48 ч с момента взятия.

При немедленном исследовании крови можно использовать гепарин, в противном случае он вызывает распад клеток.

Очищают физраствор от посторонних частиц после растворения в нем всех компонентов на специальных фильтрующих устройствах, для чего применяют стеклянные шоттовские фильтры (например, марки C_4); величина их пор должна быть в 2—3 раза меньше частиц, которые будут подсчитываться на приборе. В последнее время выпускают различные марки мембранных фильтров типа «Миллипор». Они удобны в применении, дешевы и дают надежную очистку раствора. Иногда для фильтрации растворов пользуются отмытым тальком (его наносят на крупнопористый шоттовский фильтр). При длительной работе трубки, через которые проходит физраствор, содержащий клетки и их белковые компоненты, могут заражаться грибково-бактериальной микрофлорой, также искажающей результаты измерений. Чтобы предупредить микробное загрязнение, в физраствор добавляют антисептик, а все магистрали прибора периодически очищают и дезинфицируют.

При подсчете лейкоцитов должен быть обязательно полный лизис эритроцитов. Кроме того, важным условием является величина остатков стромы эритроцитов и их агломератов. Наилучшим препаратом для разрушения эритроцитов считается очищенный сапонин, однако не все партии препарата могут отвечать требованиям автоматического анализа. Контроль полноты разрушения эритроцитов, величины остатков стромы и способности их к слипанию между собой или с лейкоцитами каждой серии препарата проводят под микроскопом (камеру для подсчета клеток заполняют лизированной суспензией и просматривают в световом микроскопе). Повышенная агрегация стромальных остатков между собой, с тромбоцитами и лейкоцитами чаще всего связана с pH раствора и его ионным составом. Как правило, оптимальные условия находят опытным путем, каждый исследователь в конкретной работе. Детали подсчета типовых клеток на каждом приборе приводятся в прилагаемой к нему инструкции.

Источники: 6, 14, 22, 25, 39, 48, 53, 63, 64, 65, 76, 82.

ЛАБОРАТОРНЫЕ КЛИНИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КРОВИ

ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ КРОВИ К АНАЛИЗАМ

Для общего клинического анализа исследуют обычно периферическую (капиллярную) кровь (сосуды ушной раковины), а для биохимических анализов — венозную. У крупного рогатого скота, лошадей, овец и коз кровь берут из яремной вены, у свиней — из ушной или из краниальной полой, у собак, кошек — из латеральной плюсневой вены.

При взятии крови соблюдают правила асептики и антисептики. Место вкола иглы тщательно протирают ватным тампоном, смоченным в спирте.

У моногастричных животных кровь берут до кормления в утренние часы, у жвачных — утром через 4 ч после кормления. Время кормления существенно влияет на содержание в крови липидов, сахара, холестерина и некоторых других показателей. Чрезмерное возбуждение животного во время взятия крови (стресс) сказывается на показателях кислотно-щелочного равновесия, сахара, многих гормонов, количестве эозинофилов и лимфоцитов. Большое влияние на биохимические показатели крови оказывают фармакологические препараты, токсические вещества, испорченные корма. Все эти факторы учитывают при отборе проб крови.

При клиническом лабораторном анализе исследуют цельную кровь, плазму и сыворотку. В цельной крови определяют общие клинические гематологические показатели, содержание сахара, кетоновых тел, меди, цинка, кобальта, марганца, селена и др.; в плазме — резервную щелочность, содержание натрия, калия, неорганического фосфора, магния, каротина, витаминов А, С и др.; в сыворотке — общий белок и его фракции, остаточный азот, мочевину, свободные аминокислоты, липиды, холестерин, билирубин, общий кальций, неорганический фосфор, магний, йод, связанный с белком (СБЙ), каротин, витамины, ферменты, белковоосадочные реакции и др.

В зависимости от характера исследований готовят одну, две или более пробирок. В пробирки для получения цельной крови или плазмы предварительно вносят одно из противосвертывающих средств (антикоагулянт). В расчете на 15—20 мл крови берут следующее количество антикоагулянта: 2—3 капли 1%-ного раствора гепарина или 3—4 капли 10%-ного раствора этилендиаминтетрауксусной кислоты натриевой соли (ЭДТА-натрия, трилон Б), 15—20 мг натрия лимоннокислого или такое же количество натрия щавелевокислого. В больших количествах добавлять эти средства нельзя, так как высокая их концентрация вызывает в крови различные изменения до гемолиза включительно. В пробирки для получения плазмы крови, где будут определять резервную щелочность, кроме антикоагулянта, добавляют по 0,5 мл вазелинового масла. При определении активности ферментов эритроцитов, кислой фосфатазы крови и некоторых других показателей в качестве антикоагулянта используют цитратно-глюкозную смесь.

Чтобы избежать гемолиза, кровь в пробирки набирают по стенке. В лабораторию кровь доставляют в день ее взятия. Для отделения сыворотки пробирку с кровью обводят тонкой спицей из нержавеющей стали и ставят в термостат при температуре 37—38°С на 1—2 ч или оставляют при комнатной температуре для окончательного отделения сыворотки. Сыворотку сливают в центрифужные пробирки и центрифугируют 20—30 мин при 2000—3000 об/мин. Для получения плазмы кровь с антикоагулянтом центрифугируют 20—30 мин при 2000—

3000 об/мин. Плазма крови отличается от сыворотки наличием фибриногена. Для исследований пригодны сыворотка и плазма без гемолиза крови. Цельную кровь, плазму и сыворотку хранят в холодильнике. Общий клинический анализ крови, определение в ней сахара проводят в день ее взятия; другие анализы обычно заканчивают в течение 2—3 дней. Для подсчета форменных элементов крови ее берут из капиллярных сосудов.

Для осуществления морфологических и биохимических исследований крови необходимо иметь оборудованную лабораторию с вытяжным шкафом, определенным набором мерной и другой посуды, приборов общего пользования (весы аналитические, весы торсионные, весы технические, центрифуги, термостат, фотоэлектроколориметр, плитки электрические и т. д.), с водопроводом, канализацией.

МЕТОДЫ КЛИНИЧЕСКОЙ ГЕМАТОЛОГИИ

К методам клинической гематологии относят подсчет количества эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, дифференциальный подсчет лейкоцитов, определение гемоглобина, осмотической резистентности эритроцитов, времени свертывания крови, времени рекальцинации плазмы, скорости оседания эритроцитов (СОЭ), длительности кровотечения, определение фибриногена в плазме и некоторые другие.

ПОДСЧЕТ ЭРИТРОЦИТОВ В КАМЕРЕ

Принцип. Точное количество крови равномерно смешивают с определенным количеством жидкости и помещают в камеру с известным объемом, в которой взвесь крови распределяется одним слоем. Дно камеры разграфлено, благодаря чему возможен точный подсчет.

Реактивы. 0,9%-ный раствор натрия хлорида.

Специальное оборудование. Микроскоп; камера Горяева; пробирки лабораторные или капилляр от гемометра Сали.

Ход определения. В сухую, чистую пробирку вносят 4 мл 0,9%-ного раствора натрия хлорида и капиллярной пипеткой 0,02 мл крови. Предварительно кончик пипетки хорошо вытирают, кровь выдувают на дно пробирки и тщательно промывают верхним слоем жидкости. Содержимое пробирки хорошо перемешивают. Получают разведение крови 1:200.

Камера и шлифованное покровное стекло должны быть вымыты и насухо вытерты. Шлифованное стекло притирают к камере так, чтобы появились радужные кольца. Стеклянной палочкой берут 1—2 капли крови из пробирки и заполняют ими камеру (начинают с края шлифованного стекла). Эритроциты подсчитывают через 1 мин после заполнения камеры при малом увеличении микроскопа (объектив — 8×, окуляр — 10× или 15×) с прикрытой диафрагмой или опущенным конденсором (в затемненном поле зрения). Счет ведут в пяти больших квадратах (или 80 малых), расположенных по диагонали. Учитывают эритроциты, лежащие внутри малого квадрата, а также на левой и верхней его линиях. Клетки, находящиеся на правой и нижней линиях квадрата, не считают.

Количество эритроцитов в 1 мкл крови определяют по формуле:

$$X = \frac{a \cdot 4000 \cdot 200}{80},$$

где X — количество эритроцитов в 1 мкл крови; a — количество эритроцитов в 80 малых квадратах; 80 — количество сосчитанных малых квадратов; 200 — степень разведения крови; 4000 — множитель, приводящий результат к объему 1 мкл крови, так как объем малого квадрата равен 1/4000 мкл.

Эритроциты обычно считают в 80 малых квадратах, кровь разводят в 200 раз, поэтому число эритроцитов умножают на 10 000 и получают окончательный результат. Количество эритроцитов выражают в млн. в 1 мкл. Для подсчета клеток в л необходимо найденное число умножить еще на 1 000 000 (10^{12}/л).

Примечание. Нельзя исследовать кровь со сгустками, подсчитывать клетки сразу после заполнения камеры (не выжидая 1 мин), использовать плохо вымытые и просушенные пипетки и пробирки, недоброкачественные реактивы, вызывающие гемолиз. При соблюдении всех правил подсчета ошибка составит 2—3%, в среднем ±2,5%.

Источники: 70, 83.

ПОДСЧЕТ ЛЕЙКОЦИТОВ В КАМЕРЕ

Принцип. Количество лейкоцитов подсчитывают в определенном объеме камеры с известным разведением крови.

Реактивы. 3%-ный раствор уксусной кислоты, подкрашенный метиленовой синью или генциан фиолетовым из расчета 1 мл 1%-ного водного раствора красителя на 100 мл уксусной кислоты.

Специальное оборудование. Микроскоп; камера Горяева; пробирки; микропипетка или капилляр от гемометра Сали.

Ход определения. В пробирку вносят 0,4 мл (0,38 мл) 3- или 5%-ного раствора уксусной кислоты, подкрашенного метиленовой синью. Капиллярной пипеткой набирают 0,02 мл крови, конец ее тщательно протирают вначале увлажненной, а затем сухой ватой или марлей, переносят в пробирку и осторожно выдувают. Пипетку ополаскивают жидкостью, кровь в пробирке тщательно перемешивают. Пипетку несколько раз ополаскивают разводящей жидкостью, набирая ее до уровня взятой крови. Пробирку закрывают резиновой пробкой и оставляют на 4 мин, периодически перемешивая содержимое.

От каждого животного целесообразно готовить по 2—3 образца крови. Счетную камеру предварительно тщательно обезжиривают спиртом, промывают дистиллированной водой и высушивают под феном, протирают мягкой фланелью.

Чистое, сухое покровное стекло притирают к камере так, чтобы появились радужные кольца. Кровь в пробирке снова перемешивают стеклянной палочкой, берут каплю крови и наносят к краю шлифованного стекла камеры. Подсчет лейкоцитов начинают спустя 1 мин после заполнения камеры, когда осядут клетки крови. Пользуются малым увеличением микроскопа (объектив — 8×, окуляр — 10×) при затемненном поле зрения, для чего опускают конденсор или суживают диафрагму.

Подсчитывают лейкоциты в 100 больших квадратах (1600 малых). Расчет проводят по формуле:

$$X = \frac{a \cdot 4000 \cdot 20}{1600}$$

где X — количество лейкоцитов в 1 мкл крови; a — количество лейкоцитов, подсчитанных в 100 больших квадратах; 1600 — количество малых квадратов; 20 — разведение крови; 4000 — множитель, приводящий результат к объему 1 мкл крови, так как объем одного малого квадрата составит $^1/_{4000}$ мкл.

В конечном итоге подсчитанное количество лейкоцитов в 100 больших квадратах умножают на 50.

Н. И. Блинов предлагает считать лейкоциты в трех горизонтальных полосах камеры (верхней, средней и нижней), то есть в $^1/_5$ части объема камеры. Найденное число клеток умножают на 111,111 (например, 64·111,111=7111 лейкоцитов) или пользуются таблицей 3.

Источники: 32, 70, 83, 94, 113.

При подсчете лейкоцитов соблюдают все те же правила, которые изложены в методике подсчета эритроцитов. Ошибка при подсчете составляет в среднем ±7.

Наиболее вероятными источниками ошибок являются травмирование тканей ушной раковины при выжимании, выдавливании крови, неравномерное перемешивание крови, не очень чистый микрокапилляр и др. Каждый лаборант перед исследованием должен выявить собственную ошибку путем многократных анализов одной и той же пробы, включая и взятие крови.

3. Таблица для подсчета лейкоцитов в камере Горяева при разведении 1:20 (по Н. И. Блинову)

№	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
10	1 110	1 221	1 332	1 443	1 554	1 665	1 776	1 887	1 998	2 109
20	2 220	2 331	2 442	2 553	2 664	2 775	2 886	2 997	3 108	3 219
30	3 330	3 441	3 552	3 663	3 774	3 885	3 996	4 107	4 218	4 329
40	4 440	4 551	4 662	4 773	4 884	4 995	5 106	5 217	5 328	5 439
50	5 550	5 661	5 772	5 883	5 994	6 105	6 216	6 327	6 438	6 549
60	6 660	6 771	6 882	6 993	7 104	7 215	7 326	7 437	7 548	7 659
70	7 770	7 881	7 992	8 103	8 214	8 325	8 436	8 547	8 658	8 769
80	8 880	8 991	9 102	9 213	9 324	9 435	9 546	9 657	9 768	9 879
90	9 990	10 101	10 212	10 323	10 434	10 545	10 656	10 767	10 878	10 990
100	11 100	11 211	11 322	11 433	11 544	11 655	11 766	11 887	11 988	12 099

Клиническое значение определения в крови эритроцитов и лейкоцитов. Содержание эритроцитов и лейкоцитов у взрослых животных в норме приведено в приложении 4.

Пониженное количество эритроцитов в крови (эритроцитопения, олигоцитемия) встречается при длительном недокорме животных, постгеморрагической, гемолитической, железодефицитной, гипопластической анемиях, фолиеводефицитной анемии, лейкозах, злокачественных новообразованиях. Олигоцитемия развивается при инфекционной анемии лошадей, гематурии крупного рогатого скота, пироплазмозе, нутталлиозе, трипанозомозе, многих острых и хронических инфекционных и инвазионных болезнях, гепатите и гепатозе, хроническом нефрите.

Повышенное содержание эритроцитов в крови (полицитемия, эритроцитоз) наблюдают при сильной диарее вследствие сгущения крови, при обильном потоотделении, непроходимости тонкого отдела кишечника, сильной мышечной нагрузке, а также у животных на высоте 1400—2000 м (и выше) над уровнем моря.

Увеличение количества лейкоцитов (лейкоцитоз) может быть патологическим и физиологическим. Патологический лейкоцитоз отмечают при гнойно-воспалительных процессах, сопровождающих пневмонию, бронхопневмонию, плеврит, перикардит, ретикулоперитонит, перитонит, абсцессы печени, эндометрит и многие другие болезни. Выраженный лейкоцитоз наблюдают при ряде инфекционных болезней, хирургической инфекции, лейкозах, лимфогранулематозе. Возникает он при отравлениях мышьяком, ртутью, укусах ядовитых насекомых и змей, а также при введении больших доз камфоры, калия йодида, белковых препаратов, вакцин, сывороток.

Физиологический умеренный лейкоцитоз бывает при беременности, после физических нагрузок, приема богатой белком пищи (у плотоядных), при стрессах.

Снижение числа лейкоцитов (лейкоцитопения) является результатом угнетения кровотворных органов, истощения их, пониженной реактивности организма. Смена лейкоцитоза лейкоцитопенией при воспалительных и гнойно-септических заболеваниях служит показателем понижения резистентности организма, угнетения кровотворения, ухудшения состояния больного животного. Лейкоцитопения может быть следствием длительного введения в организм больших доз сульфаниламидов, амидопирина, левомицетина, синтомицина, препаратов ртути, мышьяка, висмута. Отмечают ее при алейкемической форме лейкоза, отравлениях некоторыми ядами.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫЙ ПОДСЧЕТ ЛЕЙКОЦИТОВ (ЛЕЙКОГРАММА)

Принцип. Визуальная микроскопическая оценка сухих, фиксированных, окрашенных мазков крови с дифференциальным подсчетом лейкоцитов и описанием морфологии эритроцитов.

Лейкограмма выражается как процентное отношение между отдельными видами лейкоцитов крови.

Морфологическое исследование мазков крови включает следующие этапы: подготовку стекол, приготовление мазков, фиксацию мазков, микроскопическую, морфологическую оценку мазков.

Подготовка предметных стекол. Предметные стекла должны быть чистыми, обезжиренными и сухими. Стекла, бывшие в употреблении и новые, замачивают в эмалированной посуде в 2%-ном растворе хозяйственного мыла или стирального порошка («Новость», «Трис-а», «Прогресс», «Астра») с пергидролем (20 г порошка растворяют в 975 мл воды и добавляют 20 мл пергидроля). Старый мазок удаляют ватным тампоном и стекла кипятят в том же растворе 5—10 мин. Затем стекла промывают в проточной воде, насухо вытирают и помещают на 30—60 мин в смесь Никифорова (этиловый спирт 96% и диэтиловый эфир в соотношении 1:1), после чего их снова протирают насухо чистой тканью и помещают для хранения в посуду с крышкой.

Примечания. 1) длительное кипячение (более 10 мин) предметных стекол и кипячение их в алюминиевой посуде приводят к помутнению стекол; 2) полноту отмывки от щелочных средств проверяют качественной реакцией с 0,1%-ным спиртовым раствором фенолфталеина, путем нанесения 2—3 капель на чистое стекло (появление розового окрашивания свидетельствует о плохой промывке стекол).

Техника приготовления мазка. Мазок крови готовят на предварительно подготовленном обезжиренном предметном стекле (последний берут за ребра, а не за поверхность). На стекло наносят небольшую каплю крови, отступив на 1,5—2 см от узкого конца. Для размазывания капли берут шлифованное стекло несколько уже, чем предметное, на которое нанесена капля крови. Шлифованное стекло узким краем ставят под углом 45° слева от капли, слегка подвигают его вправо для соприкосновения с ней (выжидают, пока капля не расплывется по всему ребру) и легким быстрым движением ведут стекло справа налево.

При медленном размазывании ухудшается равномерность распределения форменных элементов в мазке. При нажимании одного стекла на другое многие клетки оказываются поврежденными. Если угол между стеклами меньше 45°, то большое количество клеток скапливается в конце мазка. Величина капли должна быть соразмерна так, чтобы весь мазок помещался на стекле, не доходя на 1—1,5 см до его конца. Мазок должен иметь желтоватый цвет. Густо-розоватые и красноватые мазки непригодны для счета, так как лейкоциты в них деформированы, а эритроциты лежат один на другом. Если была взята слишком большая капля, то после того, как она распределилась по ребру шлифованного стекла, последнее приподнимают, переносят на несколько миллиметров влево, вновь ставят на предметное стекло и отсюда начинают делать мазок. Мазок тут же сушат на воздухе. На сухом мазке в середине иглой пишут номер или кличку животного, при необходимости и дату взятия крови.

Фиксация мазков. *Принцип.* Фиксирующая жидкость вызывает коагуляцию белка и прикрепляет клетки к стеклу. Фиксация придает форменным элементам стойкость по отношению к содержащейся в краске воде и препятствует деформации эритроцитов и лейкоцитов.

Реактивы. Метиловый спирт (х. ч.), или эозин метиленовый синий по Май—Грюнвальду (раствор), или этиловый спирт 96%.

Оборудование. Штатив для сушки мазков; пинцет; широкогорлая банка с притертой пробкой или крышкой.

Методика. Высохшие на воздухе мазки опускают в широкогорлую банку с крышкой, выдерживают их в фиксаторе 5—10 мин, а затем извлекают пинцетом и высушивают на воздухе. В этиловом спирте мазки держат не менее 35 мин.

Для фиксации и последующей обработки необходимо отбирать правильно приготовленные тонкие мазки (мазок должен иметь желтоватый цвет, отступать от края широких сторон предметного стекла на 1—3 мм и заканчиваться «метелочкой», не доходя на 1,5—2 см до его левого узкого края).

Окраска мазков. *Принцип.* В строго нейтральной среде структурные элементы клеток крови в азур-эозиновой смеси окрашиваются в различные цвета. Щелочные компоненты клетки (цитоплазма) красятся эозином в розово-красный цвет, кислые (РНК в ядрышках и цитоплазме, ДНК в ядре) основными красителями — в голубовато-синие цвета. Для приготовления красителей и смывания их с мазков используют воду нейтральной реакции. Вода кислой реакции ослаб-

ляет действие щелочного элемента красителя (азура II), из-за чего лейкоциты плохо окрашиваются, мазки приобретают цвет эритроцитов (красный) и ядер лейкоцитов. Вода щелочной реакции ослабляет действие кислого компонента красителя (эозина), поэтому эритроциты окрашиваются в серовато-синий цвет, а ядра лейкоцитов становятся темными. Для подщелачивания и доведения воды до нейтральной реакции к ней по каплям прибавляют 1%-ный раствор натрия двууглекислого. Для нейтрализации щелочной воды добавляют 1%-ный раствор уксусной кислоты. Можно брать дистиллированную и водопроводную воду в различных сочетаниях. Реакцию воды определяют с помощью pH-метра или гематоксилина. При использовании гематоксилина к 10 мл дистиллированной воды добавляют 2—3 капли свежеприготовленного спиртового раствора гематоксилина. Вода нейтральной реакции окрашивается в бледно-фиолетовый цвет через 1—5 мин. Если окрашивание воды произошло раньше 1 мин, то она щелочная, а если позже 5 мин — кислая.

Специальное оборудование. Контейнеры для окраски мазков с кюветами или «рельсы» стеклянные с эмалированными лотками; пинцет; цилиндры или стаканы градуированные; палочки стеклянные; стаканчики химические; бутыли с притертыми пробками.

Окраска по Нохту. *Реактивы.* 1. Основные растворы красителей: азур II и эозин калия — по 1 г/л водного раствора (1 г краски растворяют в 1000 мл дистиллированной воды). Растворы хранят в посуде темного стекла с притертой пробкой при комнатной температуре. Готовы к употреблению через 14 дней со дня приготовления.

2. Фосфатный буфер или смесь Вейзе (pH 7,4—7,5): калия фосфорнокислого однозамещенного безводного (KH_2PO_4) — 0,49 г, натрия фосфорнокислого двузамещенного ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) — 1,14 г или безводного (Na_2HPO_4) — 0,909 г, дистиллированной воды — 1000 мл.

3. Рабочий раствор готовят перед употреблением, смешивая 25 мл основного раствора азура II, 20 мл основного раствора эозина калия и 55 мл буферного раствора. Пропорции красителей могут несколько варьировать, устанавливаются опытным путем во время приготовления свежей порции основных растворов красителей.

Окрашивание. Фиксированные сухие мазки помещают в контейнер, который опускают в кювету с рабочим раствором красителя и выдерживают в нем строго определенное время, подобранное для каждой партии краски (20—45 мин). Затем контейнер переносят в кювету с водопроводной водой. После этого мазки ставят вертикально в штатив для сушки. При отсутствии штатива-контейнера высушенные мазки можно красить на «рельсах», заливая мазок рабочим раствором возможно более высоким слоем (2—3 мл на мазок).

Окраска по Паппенгейму. *Реактивы.* 1. Эозин метиленовый синий по Май — Грюнвальду (раствор); при отсутствии заводского раствора готовят 5 г/л раствора сухого красителя в метиленовом спирте (х. ч.), раствор готов к употреблению через 4 дня. 2. Рабочий раствор азур-эозина по Нохту.

Окрашивание. Сухие нефиксированные мазки помещают в контейнер и опускают в кювету с раствором красителя-фиксатора Май — Грюнвальда на 5 мин, после чего контейнер с мазками ополаскивают в кювете с дистиллированной водой и помещают в кювету с рабочим раствором азур-эозина (по Нохту) на 8—15 мин. Затем смывают краску, перенося контейнер в кювету с дистиллированной водой. Мазки высушивают на воздухе.

Окраска по Романовскому — Гимзе. *Реактивы.* 1. Готовый продажный краситель Романовского — Гимзы (азур-эозиновая смесь). 2. Рабочий раствор (2 капли красителя на 1 мл дистиллированной воды) готовят перед употреблением.

Окрашивание. Фиксированные мазки в кювете заливают рабочим раствором красителя Романовского — Гимзы и выдерживают 15—30 мин. Затем мазки промывают дистиллированной водой и высушивают на воздухе. Продолжительность окраски зависит от качества красителя и температуры воздуха. Чем ниже температура воздуха, тем продолжительнее окраска. Выбор оптимального времени окраски проводят каждый раз, когда начинают использовать новый флакон заводского красителя. Хорошо окрашенные мазки имеют розово-фиолетовый цвет, недокрашенные — розово-красноватый, перекрашенные — темно-фиолетовый.

Микроскопическое исследование мазков крови. *Реактивы.* Иммерсионное масло, диэтиловый эфир или этиловый спирт.

Оборудование. Микроскоп; осветитель для микроскопа (ОИ-19, ОИ-31 и др.); 11-клавишный счетчик для выведения лейкоцитарной формулы; капельница.

Методика. Просматривают мазок крови под малым увеличением (объектив 10×, окуляр 7×). Подсчет лейкоцитов и оценка морфологии эритроцитов допустимы только в тонкой части мазка, где эритроциты лежат одиночно, а не сложены в «монетные столбики».

На край мазка помещают каплю иммерсионного масла, микроскоп переводят на иммерсионный объектив (удобно пользоваться при монокулярной насадке окуляром 7×, при бинокулярной насадке — окуляром 5×). Подсчет лейкоцитов ведут, отступив на 2—3 поля зрения от края мазка, по зигзагу (по линии «Меандра»): 3—5 полей зрения вдоль края мазка, затем 3—5 полей зрения под прямым углом к середине мазка, потом 3—5 полей зрения параллельно краю мазка и вновь под углом 90° возвратиться к краю мазка. Такое движение продолжают до тех пор, пока не будет сосчитано нужное количество клеток. Подсчитывают только целые, неразрушенные клетки.

Оценка результатов. В нормальной крови выявляют следующие формы лейкоцитов: базофилы, эозинофилы, нейтрофилы (палочко- и сегментоядерные), лимфоциты, моноциты. При наличии в мазках крови плазматических клеток, незрелых и труднодифференцируемых форм лейкоцитов их также вводят в лейкограмму.

Одновременно с выведением лейкограммы проводят оценку морфологии эритроцитов. Если в анализе крови не было выявлено отклонений от нормы в количественном составе форменных элементов крови, а при подсчете первых 100 лейкоцитов не обнаружено никаких отклонений от нормы ни в лейкограмме, ни в морфологии лейкоцитов, то можно ограничиться подсчетом этого количества клеток. Если отмечены какие-либо отклонения от нормы, подсчитывают не менее 200 лейкоцитов. Лейкограмма показывает лишь относительные величины. Более объективное представление о составе лейкоцитов крови дает вычисление их абсолютного количества, то есть содержание каждого вида лейкоцитов в определенном объеме крови.

Клиническое значение показателей лейкограммы. Процесс образования, развития и созревания клеток крови (гемопоэз — кровотворение) у человека и животных происходит в костном мозге, селезенке и в лимфатических узлах. В костном мозге образуются эритроциты, тромбоциты, моноциты и зернистые лейкоциты (базофилы, сегментоядерные нейтрофилы, эозинофилы); в лимфатических узлах и селезенке — лимфоциты. По современной схеме гемопоэза, составленной И. Л. Чертковым и А. И. Воробьевым (1973), все клетки объединены в шесть классов. Первый класс составляют полипотентные клетки-предшественницы, стволовые кровотворные клетки. Во второй класс входят клетки-предшественницы лимфопоэза и миелопоэза. Третий класс объединяет колониеобразующую в культуре клетку-предшественницу гранулоцитов и моноцитов, эритропоэтинчувствительную клетку, дающую начало эритробластическому ряду, и тромбопоэтинчувствительную клетку-предшественницу мегакариоцитарного ряда. В этот же класс включены клетки-предшественницы В-лимфоцитов и Т-лимфоцитов. Четвертый класс — это пролиферирующие бластные клетки: миелобласты, эритробласты, мегакариобласты, монобласты, лимфобласты, плазмобласты, а пятый — созревшие клетки: промегакариоциты, мегакариоциты, нормобласты, промиелоциты, миелоциты, мета-миелоциты, промоноциты, пролимфоциты. Шестой класс представлен зрелыми клетками (эритроциты, тромбоциты, сегменто- и палочкоядерные нейтрофилы, базофилы, эозинофилы, моноциты, лимфоциты), которые циркулируют в крови у здоровых животных и являются объектом для исследования (см. цв. табл. I, II, а также приложение 5).

При оценке результатов исследования лейкоцитов учитывают общее количество их в 1 мкл крови, наличие ядерного сдвига нейтрофилов, процентное соотношение отдельных видов лейкоцитов, наличие или отсутствие дегенеративных изменений в клетках.

Появление в лейкограмме молодых и дегенеративных форм нейтрофилов (ядерный сдвиг нейтрофилов) свойственно инфекционным и воспалительным процессам, злокачественным новообразованиям, интоксикациям. Различают регене-

ративный, дегенеративный и лейкемоидный ядерный сдвиг. При регенеративном сдвиге увеличивается содержание палочкоядерных и юных нейтрофилов, при дегенеративном — только палочко- и сегментоядерных нейтрофилов наряду с дегенеративными изменениями в клетках. При лейкемоидном сдвиге появляются более незрелые формы (миелоциты, промиелоциты, миелобласты) (см. цв. табл. III). Регенеративный сдвиг наблюдается главным образом при воспалительных и гнойно-септических процессах. Дегенеративный сдвиг — показатель функционального угнетения костного мозга, встречается при интоксикациях (сальмонеллез, острый перитонит, уремическая и диабетическая кома). Лейкемоидные сдвиги обычно отражают своеобразную реактивность больного организма при самых различных заболеваниях.

Эозинофилию отмечают при паразитарных болезнях (трихинеллез, описторхоз, аскаридоз, эхинококкоз и др.), ревматизме, при длительном применении антибиотиков, сульфаниламидных препаратов и других лекарственных средств, при хроническом миелолейкозе, лимфогранулематозе, злокачественных новообразованиях ожоговой болезни, обморожении, туберкулезе, эмфиземе легких. Эозинофилия при воспалительных и гнойно-септических процессах на фоне лимфоцитоза и незначительного ядерного сдвига нейтрофилов является предвестником благоприятного исхода заболевания. Увеличение числа эозинофилов отмечают при стрессах.

Эозинопения и анэозинофилия наблюдаются на высоте некоторых острых инфекционных заболеваний, в агональном состоянии.

Выраженный лимфоцитоз — характерный признак лимфолейкоза. Незначительный лимфоцитоз бывает при заболеваниях нейтрофильно-эозинопенической группы (пневмония, остеомиелит, сепсис и др.) и указывает на фазу выздоровления. Лимфоцитоз при агранулоцитозе или лимфатической лейкемоидной реакции — неблагоприятный признак, свидетельствующий о снижении микрофагоцитарной функции организма вследствие истощения гранулопоэза.

Лимфоцитоз встречается при тиреотоксикозе, гипофункции яичников и бронхиальной астме; лимфоцитопения — при некоторых тяжелых инфекциях, воспалительных и гнойно-септических заболеваниях (в прогностическом отношении является неблагоприятным симптомом); моноцитоз — при острых инфекционных заболеваниях, а также при туберкулезе, бруцеллезе, злокачественных опухолях, лимфогранулематозе и сепсисе; моноцитопения — при тяжелых септических процессах, некоторых инфекционных болезнях; базофилия — при хроническом миелолейкозе, гипофункции щитовидной железы.

Нейтрофильный лейкоцитоз (нейтрофилия) сопровождается увеличением в крови сегменто- и палочкоядерных нейтрофилов, а также появлением юных, а иногда миелоцитов, то есть ядерным сдвигом «влево». Если количество палочкоядерных нейтрофилов возрастает не больше 13% при нормальном или слегка уменьшенном количестве сегментоядерных, говорят о простом регенеративном сдвиге. Такое явление наблюдают при инфекциях, протозойных болезнях, при септических процессах. Нейтрофилия с резким регенеративным сдвигом до миелоцитов указывает на усиление воспалительных процессов. Нейтрофилия с дегенеративным сдвигом до появления атипичных клеток присуща острым инфекциям, септическим заболеваниям, осложненным вторичным процессом. Нейтропению отмечают при вирусных заболеваниях, когда угнетается нейтрофильное кровотворение в костном мозге. Появление в крови большого количества костномозговых клеток — миелоцитов, промиелоцитов и миелобластов — связано с миелолейкозом и другими злокачественными поражениями костного мозга.

При оценке результатов исследования эритроцитов обращают внимание на их размер (нормоциты, микроциты, макроциты, мегалоциты), на наличие и степень выраженности анизоцитоза и пойкилоцитоза, на особенности формы эритроцитов (овалоцитоз, микросфероцитоз, серповидность), на интенсивность окраски (нормохромные, гипохромные, гиперхромные, полихроматофильные) и наличие включений в эритроцитах (тельца Жолли, Гейнца — Эрлиха, кольца Кебота, базофильная пунктация, ядерные формы).

Источники: 32, 90, 94, 109, 110, 113.

Табл. I. Форменные элементы крови (норма):

А — крупного рогатого скота; *Б* — овцы; *1* — базофилы; *2* — эозинофилы; *3* — юные; *4* — палочкоядерные нейтрофилы; *5* — сегментоядерные нейтрофилы; *6* — малый, *7* — средний и *8* — большой лимфоциты; *9—10* — моноциты; *11* — клетки Тюрка; *12* — эритроциты и ретикулоциты (у лошади — эритроциты и тромбоциты); *13* — тромбоциты (по Н. П. Рухлядеву).

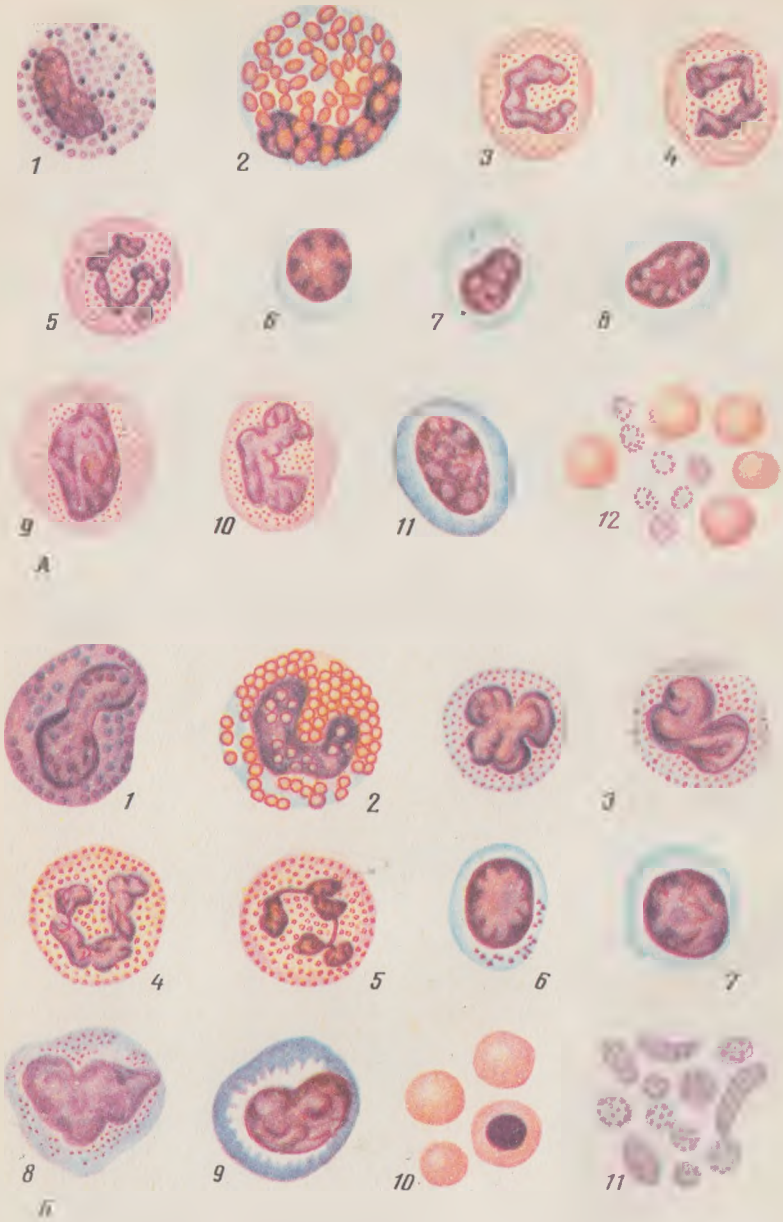


Табл. II. Форменные элементы крови (норма):

А — лошади (подпись см. в табл. 1); *Б* — свиньи; *1* — базофилы; *2* — эозинофилы; *3* — юные нейтрофилы; *4* — палочкоядерные и *5* — сегментоядерные нейтрофилы; *6* — малые и *7* — большие лимфоциты; *8* — моноциты; *9* — клетки Тюрка; *10—11* — эритроциты и тромбоциты (по Н. П. Рухлядеву).

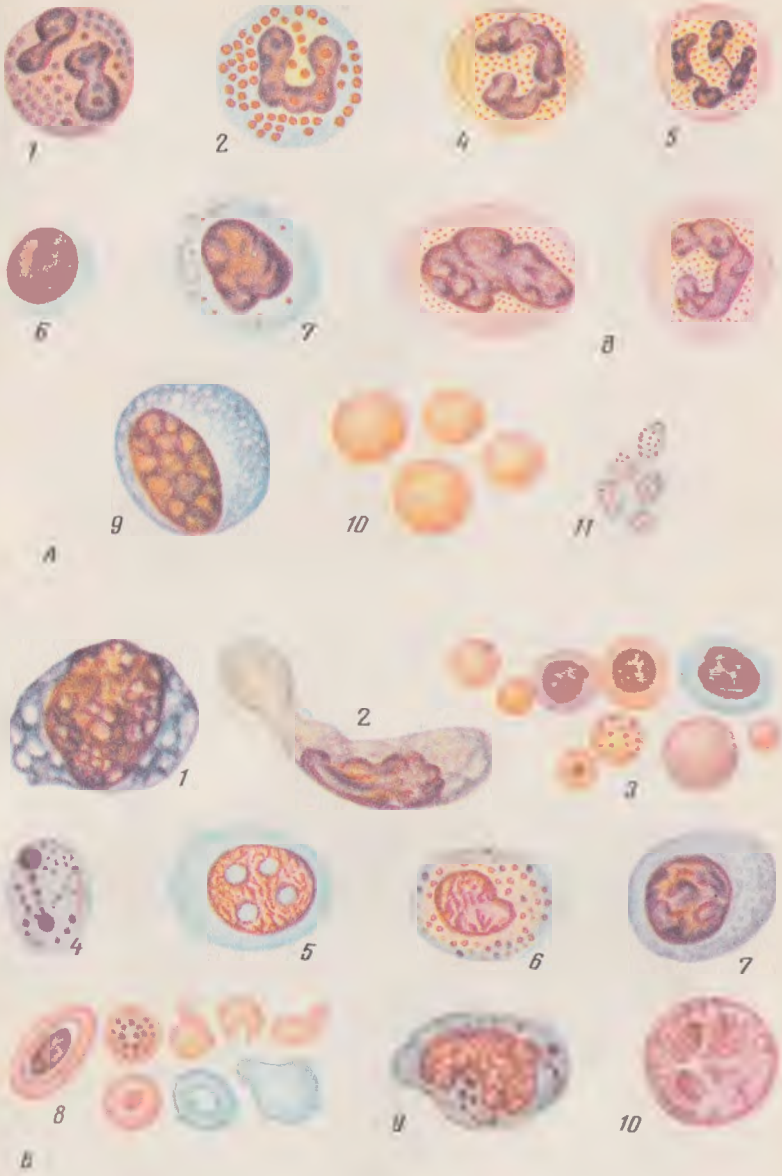
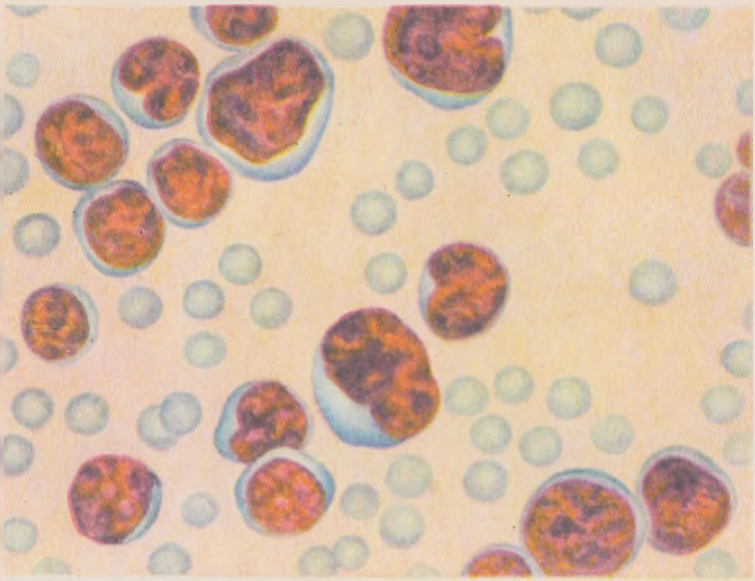
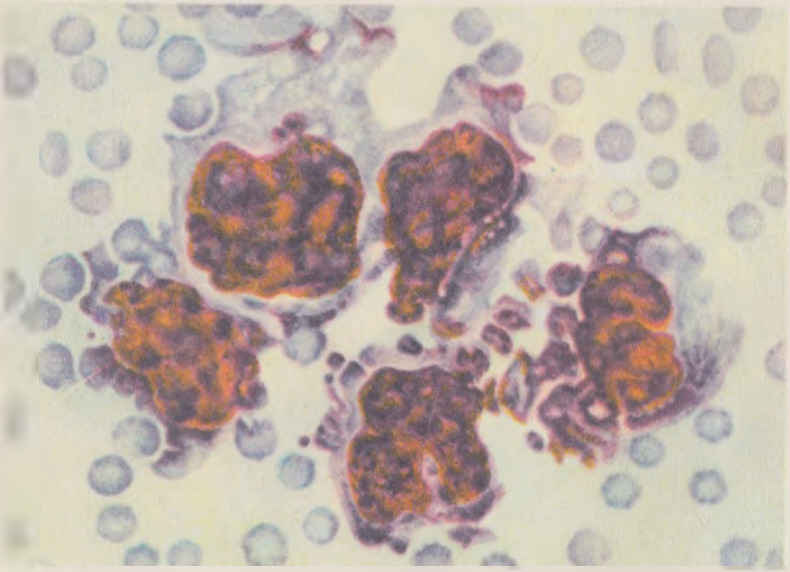


Табл. III. Форменные элементы крови.

А — собаки (подпись см. в табл. II); *Б* — патологически измененные форменные элементы крови; *1* — вакуолизированная клетка Гюрка; *2* — гистиоцит (ретикулоэндотелиальная клетка с фагоцитированным эритроцитом и вакуолями); *3* — патологически измененные эритроциты (*вверху* — три эритроцита с ядрами, *в левом нижнем углу* — эритроцит с тельцами Жолли, *рядом в середине* — эритроциты с базофильной зернистостью, *остальные* эритроциты — различные по величине и по насыщению гемоглобином); *4* — полиморфноядерный эритроцит с капельным распадом ядра; *5* — миелобласт; *6* — нейтрофильный миелоцит; *7* — мегалобласт; *8* — пойкилоциты (*вверху*), ретикулоциты (*в середине*), полихроматофилы (*внизу*); *9* — миелобласт с вакуолями в ядре; *10* — сегментоядерный псевдоэозинофил с резко выраженной вакуолизацией цитоплазмы (по Н. П. Рухлядеву).



А



Б

Табл. IV. Поражение крови и лимфоузлов:

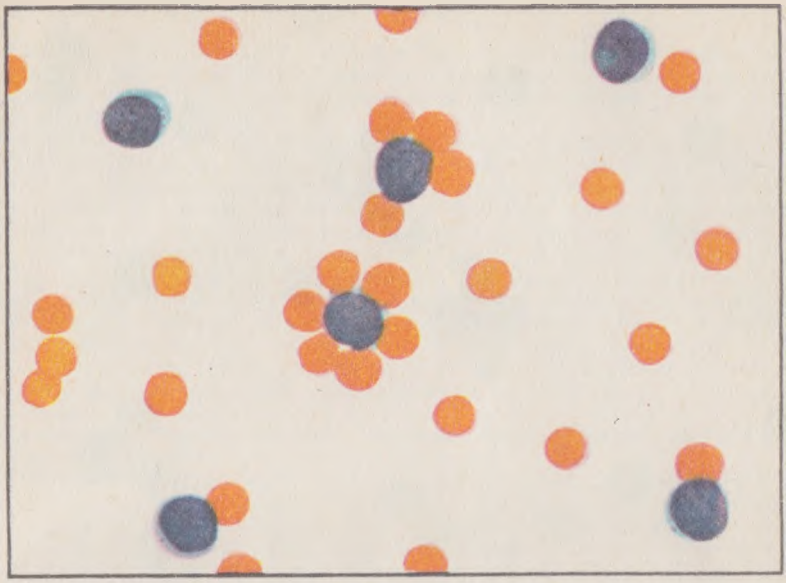
А — лимфоциты крови коровы при лимфолейкозе; *Б* — опухолевидные клетки в лимфатических узлах и в крови при ретикулезе (по Г. А. Симоняну).

Табл. V. Различные виды цилиндров:

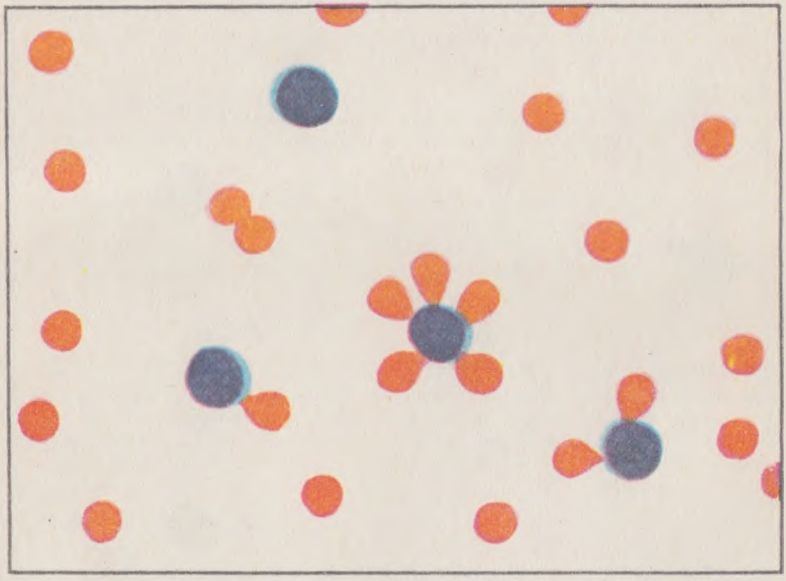
А : *1* — гиалиновые; *2* — восковидные; *3* — зернистые; *Б* : *1* — жировой; *2* — эритроцитарный; *3* — лейкоцитарный; *4* — эпителий; *5* — цилиндроиды; *6* — грибы (по Л. Н. Кочубей).

Табл. VI. Морфология неорганического осадка мочи:

а — 1 — кальций щавелевокислый; 2 — кальция сульфат; 3 — кристаллы мочевой кислоты; 4 — ураты; б — 1 — трипельфосфат; 2 — аммоний мочекислый; 3 — гиппуровая кислота; 4 — ураты



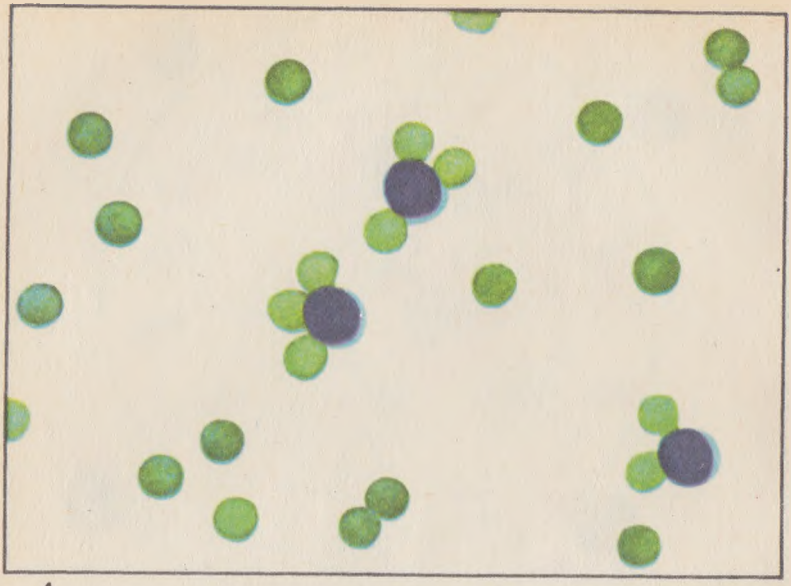
А



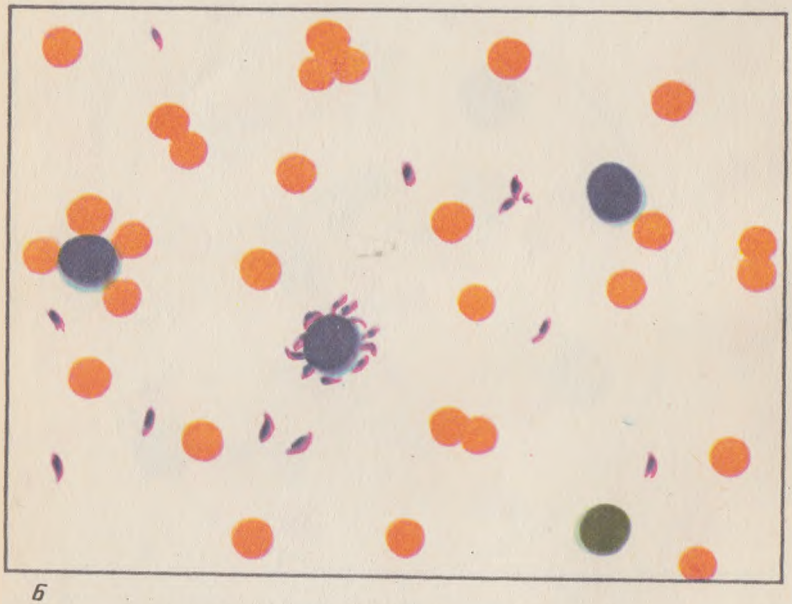
Б

Табл. VII.

Е-розетки, образованные лимфоцитами теленка с эритроцитами барана (*А*); *Б* — при повышенном режиме ресуспендирования эритроциты принимают форму воздушного шара, что свидетельствует о прочности иммунных связей.



А



Б

Табл. VIII.

А — характерное прилипание эритроцитов барана к поверхности Т-лимфоцитов теленка до поения молозивом, свидетельствующее о зональном расположении рецепторов на поверхности лимфоцита; *Б* — ЗС -розетки; В-лимфоцит, окруженный частицами зимозана нагруженного комплементом.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕМОГЛОБИНА КРОВИ ГЕМИГЛОБИН-ЦИАНИДНЫМ МЕТОДОМ (С АЦЕТОНЦИАНГИДРИНОМ)

Принцип. Гемоглобин при взаимодействии с железосинеродистым калием окисляется в метгемоглобин (гемиглобин), образующий с ацетонциангидрином окрашенный гемиглобинцианид, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию гемоглобина.

Реактивы. 1. Трансформирующий раствор: ацетонциангидрин — 0,5 мл, калий железосинеродистый (красная кровяная соль) — 200 мг, натрий двууглекислый 1 г, дистиллированная вода до 1 л; стабилен при хранении в посуде из темного стекла при комнатной температуре в течение нескольких месяцев; при появлении осадка или обесцвечивании раствор к употреблению непригоден.

2. Калибровочный раствор гемиглобинцианида. В качестве калибровочного раствора применяют стандартные растворы, отвечающие международному эталонному раствору гемиглобинцианина. Концентрация гемиглобинцианида в стандартном растворе завода «Реагент» и фирмы «Реанал» — 59,75 мг%, фирмы «Имуна» — 62,23 мг%. Это соответствует концентрации гемоглобина в крови 15 г% и 15,4 г% при разведении крови в 251 раз. Стандартные растворы хранят в холодильнике при +4°С (предостерегают от замерзания). Применяют в неразведенном виде.

Специальное оборудование. Фотоэлектроколориметр; пипетка на 0,02 мл или капилляр от гемометра Сали; колба мерная на 1 л.

Ход определения. Опытная проба. В пробирку вносят 5 мл трансформирующего раствора и 0,02 мл крови (разведение в 251 раз), хорошо перемешивают, оставляют на 10 мин, после чего смесь измеряют на фотоэлектроколориметре при длине волны 500—560 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 1 см против холостой пробы (трансформирующий раствор). Стандартный раствор измеряют при тех же условиях, что и опытную пробу.

Расчет содержания гемоглобина определяют по формуле:

$$\text{Нв в г \%} = \frac{E_{оп}}{E_{ст}} CK \cdot 0{,}001,$$

где $E_{оп}$ — экстинкция опытной пробы; $E_{ст}$ — экстинкция стандартного раствора; C — концентрация гемиглобинцианида в стандартном растворе, мг%; K — коэффициент разведения крови в опытной пробе; 0,001 — коэффициент для пересчета гемоглобина из мг% в г%.

Стандартный раствор гемоглобина колориметрируют в неразведенном виде. Концентрация гемиглобинцианида в стандартном растворе — 59,75 мг%, что соответствует при разведении крови в 251 раз концентрации гемоглобина в крови 15 г%. Таким образом, расчет гемоглобина можно проводить по формуле:

$$\text{Нв в г \%} = \frac{E_{оп}}{E_{ст}} \cdot 15.$$

Клиническое значение. Снижение гемоглобина отмечают при дефицитных анемиях вследствие недостатка железа, меди, кобальта, витамина B_{12}, фолиевой кислоты, белков и других веществ, при хронических интоксикациях, гепатите, гепатозе, кетозе, расстройствах желудочно-кишечного тракта, инфекционных и инвазионных болезнях и других заболеваниях. Нормальные величины см. приложение 6.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕМАТОКРИТА

Определение гематокрита с помощью микроцентрифуги. *Реактивы.* Антикоагулянты: гепарин — 5000 МЕ/мл разводят дистиллированной водой в соотношении 1 : 5 или этилендиаминтетрауксусной кислоты, динатриевая соль (ЭДТА—Na, трилон Б) 40 г/л.

Оборудование. Микроцентрифуга МЦГ-8; капиллярные трубки, имеющиеся в комплекте центрифуги (можно использовать капилляры для определения С-реактивного белка).

Ход определения. Для предотвращения свертывания крови капилляры обрабатывают антикоагулянтом и высушивают. Заполняют капилляры на ⅔ длины кровью. Закупоривают капилляры с одного конца специальной пастой или пластилином и помещают в ротор центрифуги так, чтобы закупоренные концы упирались в резиновую прокладку; центрифугируют 5 мин при 8000 об/мин. Определяют гематокритную величину по отсчетной шкале, прилагаемой к центрифуге.

Определение гематокрита микрометодом в модификации Й. Тодорова. *Реактивы* те же.

Оборудование. Центрифуга; пипетки Панченкова.

Ход определения. В обработанную антикоагулянтом пипетку Панченкова с отрезанным верхним концом набирают кровь точно до верхней метки, закупоривают пипетку, обтягивая ее резиновым кольцом, и центрифугируют 30—45 мин при 3000 об/мин. Для каждой центрифуги устанавливают определенное время работы. Вычитают из 100 высоту столбика эритроцитов и получают гематокритную величину в %. Нормальные величины для венозной крови указаны в приложении 6.

Источник: 84.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВРЕМЕНИ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

Принцип. Определение времени образования сгустка венозной крови.

Оборудование. Водяная баня; пробирки высотой 10 см с внутренним диаметром 1 см; секундомер.

Ход определения. Сухой иглой из вены, выпустив первые капли, берут кровь в две сухие стеклянные пробирки (по 1 мл в каждую) и тут же включают секундомер. Пробирки с кровью ставят в водяную баню при температуре 37°С. Через 2 мин после взятия крови, а затем через каждые 30 с пробирки наклоняют на 45—60°. Если кровь не свернулась, она растекается по стенке пробирки. Если кровь не выливается при переворачивании пробирок вверх дном, свертывание считается законченным. В этот момент секундомер выключают. Время свертывания выражают в минутах (среднее значение из двух определений).

Клиническое значение. Нормальные величины показателей свертывания крови приведены в приложении 6. Замедленное свертывание крови отмечают при анемиях, кровопятнистой болезни, геморрагическом диатезе, нефрите, гемофилии, удушье, сибирской язве, пироплазмозе, бабезиозе и других пироплазмидозах. Ускоренное свертывание крови характерно для миоглобинурии, крупозного воспаления легких, обезвоживания и др.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СКОРОСТИ ОСЕДАНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ (СОЭ) МИКРОМЕТОДОМ ПАНЧЕНКОВА

Принцип метода основан на использовании свойств крови, смешанной с раствором цитрата натрия, не свертываться при стоянии, а разделяться на два слоя: нижний — эритроциты и верхний — сыворотка. Это расслоение происходит с различной скоростью в зависимости от изменений химических и физических свойств крови.

Реактивы. 5%-ный раствор натрия лимоннокислого трехзамещенного 5-водного. Раствор фильтруют. pH раствора нейтральный или слабощелочной. Реактив нестойкий, при помутнении его заменяют.

Оборудование. Пробирки размером 10×1 см и аппарат Панченкова. Последний состоит из штатива с гнездами и зажимами для специальных капиллярных пипеток с просветом канала 1 мм. На пипетках нанесена миллиметровая шкала длиной 10 см. Верхнее деление шкалы отмечено 0 и буквой К (кровь). Через каждые 10 делений имеются цифры — 10, 20, 30 и т. д. до 100. Против деления 50 имеется буква Р (реактив). Отверстия концов капиллярных пипеток, вставленных в прибор, герметически закрываются резиновыми прокладками или пробками, и кровь из пипетки не выливается. Капиллярные пипетки и пробирки должны быть хорошо промыты хромовой смесью.

Ход определения. В капиллярную пипетку, предварительно промытую рас-

твором цитрата натрия, набирают этот раствор до метки «Р» и вводят в пробирки размером 10×1 см. Затем тем же капилляром набирают 2 раза кровь из ушной вены до метки «К» и вносят ее каждый раз в ту же пробирку. Хорошо смешивают, насасывают в капилляр до отметки «0» и, заметив время, ставят в штатив. Через 1 ч отсчитывают по делениям капиллярной пипетки величину оставшегося столбика плазмы.

Скорость оседания выражают за 1 ч.

Клиническое значение. Замедление СОЭ отмечают при диарее (тяжелой форме диспепсии молодняка), обильном потении, полиурии, механической и паренхиматозной желтухах, непроходимостях кишечника. Повышение СОЭ наблюдают при большинстве воспалительных процессов, инфекциях, злокачественных опухолях, коллагенозах, нефрозе, анемиях.

БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КРОВИ

ПОКАЗАТЕЛИ КИСЛОТНО-ЩЕЛОЧНОГО СОСТОЯНИЯ

Состояние кислотно-щелочного равновесия и pH крови поддерживается четырьмя основными буферными системами: гемоглобиновой, бикарбонатной, фосфатной и белковой. Наиболее лабильной, поддающейся определению является бикарбонатная буферная система $H_2CO_3/NaHCO_3$.

Показателями кислотно-щелочного состояния крови служат pH, парциальное давление угольной кислоты (PCO_2), стандартные бикарбонаты (СБ), буферные основания (БО), избыток оснований (ИО). Эти показатели тотчас же определяют в цельной крови, взятой без доступа воздуха, на приборах типа «Аструп», «Азив» и др. В ветеринарной практике такой анализ провести трудно, поэтому о кислотно-щелочном состоянии судят по результатам определения резервной щелочности плазмы крови, полученной без доступа воздуха.

Под резервной щелочностью понимают запас бикарбонатов крови, определенный по общему CO_2. Известно, что углекислый газ содержится в основном в составе бикарбонатов крови и только $^1/_{20}$ его находится в растворенном и свободном состоянии. Такая малая доля не оказывает существенного влияния на оценку состояния бикарбонатной системы по общему CO_2.

Определение резервной щелочности крови диффузионным методом с помощью сдвоенных колб по И. П. Кондрахину. *Принцип метода.* В одной половине колбы плазма крови обрабатывается серной кислотой, благодаря чему выделяется углекислый газ, находящийся в составе бикарбонатов. Выделившийся CO_2 поглощается раствором едкого натра, который находится в другой половине колбы. Избыток NaOH, не вошедший в реакцию с углекислым газом, и половину натрия углекислого (Na_2CO_3), образовавшегося в процессе поглощения CO_2, оттитровывают раствором серной кислоты. По количеству связанного первоначального едкого натра определяют количество выделенного из плазмы CO_2, которое эквивалентно содержанию бикарбонатов.

Реактивы. 1. 0,1 н. (0,05 моль/л) раствор серной кислоты (готовят из фиксанала).

2. 0,02 н. (0,01 моль/л) (точно) раствор серной кислоты (готовят из 0,1 н. раствора серной кислоты).

3. 0,1 н. раствор едкого натра.

4. 0,02 н. (0,02 моль/л) раствор едкого натра [готовят из 0,1 н. (0,1 моль/л) раствора едкого натра; титр этого раствора проверяют перед анализом и доводят до нужной величины].

5. 5%-ный раствор серной кислоты.

6. 1%-ный спиртовой раствор фенолфталеина.

Оборудование. Сдвоенные колбы с резиновыми пробками (30 шт. и более); микробюретки на 2 и 5 мл; центрифужные пробирки из толстого стекла.

Ход определения. В чистые, сухие центрифужные пробирки вносят 0,5—1 мл вазелинового масла, 1—2 капли 1%-ного раствора гепарина. Кровь берут из яремной вены в подготовленную пробирку, закрывают пробкой, осторожно перемешивают. В лаборатории центрифугируют ее при 3000 об/мин в течение 20 мин. Плазму крови хранят в холодильнике при температуре 4°.

По количеству проб крови с учетом параллельных исследований подбирают сдвоенные колбы и не менее трех сдвоенных колб оставляют для контроля. Точность результатов всей серии исследований полностью зависит от точности титрования раствора NaOH в контрольных колбах. Все колбы закрывают резиновыми пробками.

Анализы проводят серийно. В одну из каждой пары сдвоенных колб, поочередно открывая, вносят с помощью бюретки или пипетки (не выдувая) по 2 мл 0,02 н. раствора едкого натра и плотно закрывают пробкой. В смежную колбу, кроме контрольных (опять поочередно открывая и закрывая), вносят из пипетки (не выдувая) 0,5 мл плазмы крови, находящейся под вазелиновым маслом. После этого в колбы с плазмой (контрольные без плазмы), также поочередно, вносят из пипетки (не выдувая) по 1 мл 5%-ного раствора серной кислоты и быстро плотно закрывают пробкой. Проверяют, хорошо ли закрыты колбы, осторожно вращательными движениями перемешивают плазму крови с кислотой и оставляют на 4 ч (можно и больше, обычно на ночь). Перемешивание плазмы с кислотой проводят не менее 3 раз. Через 4 ч (или утром следующего дня) приступают к титрованию. Для этого поочередно открывают колбу, где находится раствор едкого натра, вносят туда 1—2 капли раствора фенолфталеина и титруют из микробюретки на 2 мл 0,02 н. раствором серной кислоты до полного обесцвечивания раствора. Титрование опытных и контрольных проб проводят с одинаковой скоростью.

По разнице результатов титрования в контрольных и опытных образцах устанавливают количество мл 0,02 н. раствора едкого натра, связанного с углекислым газом, вытесненным из бикарбонатов плазмы. Расчет ведут по формуле:

$$X \text{ об } \% \, CO_2 = \frac{(V_к - V_п) \cdot 0,448}{V_{пл}} = 100; \text{ или } (V_к - V_п) \cdot 89,6,$$

где $V_к$ — количество 0,02 н. раствора серной кислоты в мл, пошедшей на титрование контроля; $V_п$ — количество 0,02 н. раствора серной кислоты в мл, пошедшей на титрование исследуемого образца; $V_{пл}$ — количество плазмы крови в мл (в методике принято равным 0,5 мл); 0,448 — коэффициент пересчета 0,02 н. раствора едкого натра на CO_2 в условиях данной реакции; 100 — коэффициент для пересчета результатов анализа на 100 мл плазмы крови. Ошибка ±3%.

Клиническое значение. Нормативы показателей резервной щелочности плазмы крови животных приведены в приложении 6.

Снижение резервной щелочности крови свидетельствует о сдвиге кислотно-щелочного равновесия в сторону ацидоза, а повышение — алкалоза. Метаболический ацидоз отмечают при однотипном высококонцентратном или силосно-жомовом кормлении, кетозе, вторичной остеодистрофии, ацидозе рубца, сахарном диабете, расстройствах желудочно-кишечного тракта, особенно при диарее молодняка, нефрите, нефрозе, септических процессах и т. д. Газовый ацидоз развивается вследствие замедления процесса отдачи углекислоты легкими при расстройстве сердечной деятельности, эмфиземе легких, при нахождении животных в среде с высокой концентрацией в воздухе углекислоты. Метаболический алкалоз у животных наблюдают при алкалозе рубца, введении в организм больших доз пищевой соды, а газовый — при усиленной гипервентиляции легких, выведении из организма большого количества углекислого газа, а также при содержании животных на большой высоте.

Источники: 44, 46, 73, 87.

Определение резервной щелочности крови с помощью титратора Т-110. *Принцип.* В основе лежит определение резервной щелочности крови диффузионным методом с помощью сдвоенных колб. Титрацию щелочи в ячейках осуществляют с помощью прибора. При этом конечная точка титрования устанавливается при pH 7. Количество раствора, пошедшего на титрование, определяют по показанию счетчика автоматической бюретки (Б-701).

Реактивы те же, что и при определении резервной щелочности крови с помощью сдвоенных колб.

Оборудование. Лабораторный титратор Т-110 (рис. 3) с комплектом ячеек; микробюретки на 2 и 5 мл; центрифужные пробирки.

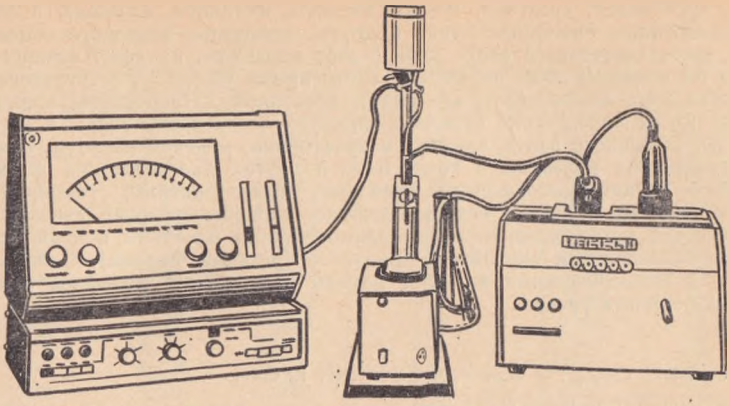


Рис. 3. Титратор Т-110.

Определение резервной щелочности в плазме крови, расчет результатов исследования проводят согласно инструкции, прилагаемой к прибору.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛКОВОГО ОБМЕНА

Для оценки состояния белкового обмена, а также функций отдельных органов и систем в клинической ветеринарии проводят определение в сыворотке (плазме) крови общего белка и его фракций, остаточного азота, мочевины, азота аминокислот, креатина и других метаболитов.

Для определения общего белка сыворотки (плазмы) крови используют методы сжигания (кьельдалеметрические), нефелометрические, рефрактометрические, спектрофотометрические и др. В ветеринарных лабораториях преимущественно пользуются рефрактометрическим и колориметрическим (биуретовым) методами.

При определении белковых фракций сыворотки крови используют электрофоретические методы (на агаровом геле, в полиакриламидном геле, на бумаге, на ацетате целлюлозы), методы высаливания нейтральными солями (аммонием сернокислым, натрием сернокислым, фосфорнокислым), седиментационные (разделение белков на фракции ультрацентрифугированием), методы разделения белков путем осаждения этиловым спиртом при низкой температуре, иммуноэлектрофоретические методы.

В клинической практике для разделения белков сыворотки крови чаще пользуются электрофоретическими методами. При электрофорезе на бумаге получают 5 основных фракций: альбумины, альфа$_1$-, альфа$_2$-, бета- и гамма-глобулины. Недостатками метода являются длительность проведения анализа (результаты исследования можно получить только на 2–3-й день), нечеткое разделение фракций белков вследствие химической неоднородности бумаги. Электрофорезом на агаровом геле получают более четкое разделение белковых фракций, чем на бумаге, однако сложность процедуры приготовления геля и невозможность его дальнейшего хранения в готовом виде не позволяют широко внедрить этот метод в лабораторную практику. С помощью электрофореза на полиакриламидном геле можно получить около 30 фракций белков. Недостатком метода является трудность количественной оценки получения фракций.

Широкое распространение находит метод электрофореза на ацетате целлюлозы, который в медицинской практике признан как унифицированный.

При отсутствии в лаборатории аппарата для электрофореза используются методы осаждения белков нейтральными солями с последующим турбидиметрическим измерением степени помутнения среды на ФЭКе.

Под остаточным (небелковым) азотом понимают количество азота, которое остается в крови после осаждения белков. Сюда входит азот мочевины, амино-

кислот, креатинина, креатина, мочевой кислоты, индикана, аммиака, полипептидов, нуклеотидов, биогенных аминов и других продуктов белкового обмена. Основная часть остаточного азота крови — азот мочевины, на долю которого приходится не менее $^1/_2$ всего небелкового азота крови. Около $^1/_4$ остаточного азота составляет азот аминокислот, креатина и креатинина. Наибольшее клиническое значение имеет определение отдельных фракций остаточного азота, в частности мочевины, амминного азота, креатина и креатинина, мочевой кислоты, индикана. Для определения мочевины в крови, моче и других биологических жидкостях применяют диацетилмонооксимные, уреазные, гипохлоритные, гипобромидные, ксантигидроловые и другие методы. Наиболее распространенным считают колориметрический метод, основанный на взаимодействии мочевины и диацетилмонооксима с образованием окрашенных продуктов (реакция Фирона). Однако более точными и специфическими являются методы определения мочевины с использованием фермента уреазы.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО БЕЛКА СЫВОРОТКИ КРОВИ РЕФРАКТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Принцип. В основу рефрактометрических методов анализа положено определение показателя (коэффициента) преломления исследуемого вещества. Показателем преломления называют отношение синуса угла падения луча света к синусу угла его преломления. В сыворотке крови величина рефракции в первую очередь зависит от количества белков.

Реактивы и оборудование. Смесь этилового спирта с эфиром 1 : 1; рефрактометр типа РДУ, ИРФ, УРЛ, RL (ПНР) и др.

Ход определения. Устанавливают прибор на нуль по дистиллированной воде при температуре 20°. Предварительно верхнюю и нижнюю камеры протирают марлевой салфеткой, смоченной смесью спирта с эфиром, и насухо ватным тампоном. Поверхность призм при установке прибора на нуль и исследовании образца сыворотки крови должна быть чистой и сухой, от этого во многом зависит результат анализа.

Окуляр шкалы коэффициентов преломления ставят в крайнее положение на себя. Опускают нижнюю половину камеры, на призму наносят 1—2 капли дистиллированной воды. Камеру закрывают, окуляр шкалы и окуляр зрительной трубы устанавливают на резкость. Дисперсию в окуляре зрительной трубы устраняют вращением винта лимба дисперсии.

Линию окуляра шкалы устанавливают на цифру 1,3330 (показатель преломления воды) и в зрительную трубу наблюдают границу светотени по отношению к точке пересечения двух взаимно перпендикулярных линий. Если граница светотени проходит через точку пересечения линий, то прибор установлен на нуль. Если этого нет, то при помощи ключа и маленького винта на корпусе зрительной трубы ставят границы светотени на точку пересечений линий. Поверхность призм досуха вытирают мягкой марлевой салфеткой и ватным тампоном. Приступают к исследованию образцов крови. Стеклянной палочкой из пипетки наносят на нижнюю призму 1—2 капли сыворотки крови и плотно закрывают камеру. Зеркалом направляют свет в окно камеры и поворачивают винт до тех пор, пока граница светотени не достигнет пересечения двух визирных линий.

Через окуляр по шкале отсчета показателя преломления дважды производят его отсчет. Вычисляют среднее показание. Марлевой салфеткой удаляют с поверхности призм сыворотку, протирают поочередно ватными тампонами, сухим и смоченными спиртово-эфирной смесью. Стеклянную палочку промывают в дистиллированной воде и высушивают марлей или ватой. Исследуют следующую пробу.

Содержание белка (в %) определяют по таблице 4 с учетом величины показателя преломления рефрактометра.

Если температура в камере во время исследования не соответствует 20°С, то вводят поправку 0,0001 на каждый градус: в случае низкой температуры поправку вычитают, при более высокой — прибавляют.

Клиническое значение. Белки крови выполняют многие функции: поддерживают постоянство онкотического давления, pH крови, уровень катионов

4. Вычисление общего белка сыворотки крови по показателю преломления

Показатель преломления	Белок, %	Показатель преломления	Белок, %	Показатель преломления	Белок, %
1,3431	4,16	1,3492	7,68	1,3532	9,99
1,3435	4,38	1,3493	7,73	1,3533	10,05
1,3439	4,60	1,3494	7,79	1,3534	10,10
1,3443	4,81	1,3495	7,83	1,3535	10,17
1,3446	5,03	1,3496	7,91	1,3536	10,23
1,3450	5,25	1,3497	7,96	1,3537	10,28
1,3454	5,47	1,3498	8,02	1,3538	10,33
1,3458	5,68	1,3499	8,08	1,3539	10,39
1,3460	5,92	1,3500	8,14	1,3540	10,44
1,3461	5,97	1,3501	8,20	1,3541	10,49
1,3462	6,02	1,3502	8,26	1,3542	10,54
1,3463	6,07	1,3503	8,33	1,3543	10,60
1,3464	6,12	1,3504	8,38	1,3544	10,64
1,3465	6,18	1,3505	8,44	1,3545	10,70
1,3466	6,23	1,3506	8,49	1,3546	10,75
1,3467	6,29	1,3507	8,55	1,3547	10,80
1,3468	6,34	1,3508	8,61	1,3548	10,86
1,3469	6,40	1,3509	8,67	1,3549	10,92
1,3470	6,45	1,3510	8,73	1,3550	10,98
1,3471	6,50	1,3511	8,80	1,3551	11,04
1,3472	6,55	1,3512	8,86	1,3552	11,09
1,3473	6,60	1,3513	8,92	1,3553	11,15
1,3474	6,65	1,3514	8,97	1,3554	11,21
1,3475	6,71	1,3515	9,03	1,3555	11,26
1,3476	6,77	1,3516	9,08	1,3556	11,32
1,3477	6,82	1,3517	9,14	1,3557	11,37
1,3478	6,88	1,3518	9,20	1,3558	11,42
1,3479	6,93	1,3519	9,26	1,3559	11,47
1,3480	7,04	1,3520	9,32	1,3560	11,52
1,3481	7,10	1,3521	9,40	1,3561	11,57
1,3482	7,15	1,3522	9,46	1,3562	11,62
1,3483	7,20	1,3523	9,51	1,3563	11,67
1,3484	7,25	1,3524	9,57	1,3564	11,71
1,3485	7,31	1,3525	9,63	1,3565	11,77
1,3486	7,36	1,3526	9,68	1,3566	11,82
1,3487	7,42	1,3527	9,73	1,3567	11,87
1,3488	7,48	1,3528	9,78	1,3568	11,93
1,3489	7,54	1,3529	9,84	1,3569	11,98
1,3490	7,59	1,3530	9,89	1,3570	12,04
1,3491	7,63	1,3531	9,94	1,3571	12,10

в ней; играют важную роль в образовании иммунитета, комплексов с углеводами, липидами, гормонами и другими веществами.

Альбумины и фибриноген крови образуются в печеночных клетках, глобулины в клетках РЭС костного мозга и печени. Поэтому содержание сывороточных белков во многом зависит от состояния печени. При болезнях печени снижается синтез альбуминов и фибриногена, увеличивается образование глобулинов (за исключением цирроза), наступает диспротеинемия, нарушаются процессы обновления белков. Нормативы содержания общего белка сыворотки крови приведены в приложении 6.

Снижение общего белка сыворотки крови (гипопротеинемия) отмечают при длительном недокорме животных, алиментарной остеодистрофии, уровской болезни, гипокобальтозе, энзоотическом зобе, хронических расстройствах желудочно-кишечного тракта, нефрите и нефрозе, циррозе печени, туберкулезе и др.

Повышение уровня общего белка сыворотки крови (гиперпротеинемия) в условиях интенсивного ведения животноводства встречается значительно чаще, чем гипопротеинемия. Она бывает при белковом перекорме, кетозе, вторичной остеодистрофии, токсикозах и других болезнях, сопровождающихся дистрофией (за исключением цирроза) или воспалением печени. Общий белок в этих случаях повышается за счет глобулиновых фракций при одновременном уменьшении концентрации альбуминов. Гиперпротеинемию отмечают также при тяжелых формах диареи, дегидратации организма, острых воспалительных процессах, флегмоне, сепсисе.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО БЕЛКА СЫВОРОТКИ КРОВИ ПО БИУРЕТОВОЙ РЕАКЦИИ

Принцип. Белки реагируют в щелочной среде с сернокислой медью; при этом образуются соединения, окрашенные в фиолетовый цвет.

Реактивы. 1. 0,9%-ный раствор натрия хлорида.

2. 0,2 н. (0,2 моль/л) раствор едкого натра, свободный от углекислого газа. 8 г вещества вносят в мерную колбу на 1 л и приливают до метки кипяченой дистиллированной водой или готовят из 1 н. (моль/л) раствора едкого натра: 20 мл 1 н. раствора NaOH доводят до 100 мл кипяченой дистиллированной водой.

3. Биуретовый реактив основной. 4,5 г сегнетовой соли ($KNaC_4H_4O_6$) растворяют в мерной колбе на 100 мл в 40 мл 0,2 н. раствора едкого натра. После растворения прибавляют 1,5 г меди сульфата ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) и 0,5 г калия йодида (KJ). Перемешивают до полного растворения и доводят до 100 мл 0,2 н. раствором едкого натра. Хранят в посуде из темного стекла. Реактив стоек.

4. 0,5%-ный раствор калия йодида в 0,2 н. растворе едкого натра. 2,5 г калия йодида вносят в мерную колбу на 500 мл и доливают до метки 0,2 н. раствором едкого натра. Хранят в посуде из темного стекла не более 2 нед.

5. Рабочий раствор биуретового реактива. Смешивают одну часть основного биуретового раствора (3) с четырьмя частями 0,5%-ного раствора калия йодида (4). Хранят в холодильнике в темной посуде не более 2 нед.

6. Стандартный раствор альбумина, основной. В пробирку вносят 1 г кристаллического сывороточного (из человеческой или бычьей сыворотки) альбумина и 9 мл 0,9%-ного раствора хлористого натрия. Тщательно перемешивают. 1 мл раствора содержит 0,1 г белка. Хранят в холодильнике. Сывороточный альбумин должен отвечать требованиям стандарта.

Оборудование. Фотоэлектроколориметр; колбы мерные.

Ход определения. К 0,1 мл сыворотки крови прибавляют 5 мл рабочего раствора биуретового реактива, смешивают, избегая образования пены. Через 30 мин (но не позже чем 1 ч) измеряют оптическую плотность на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 540—560 нм (зеленый светофильтр) против контроля (5 мл рабочего раствора биуретового реактива и 0,1 мл 0,9%-ного раствора натрия хлорида).

Расчет ведут по калибровочному графику, для построения которого готовят рабочие стандартные растворы из основного стандартного раствора 10%-ного белка (табл. 5).

5. Приготовление рабочих стандартных растворов белка

№ пробирки	Основной стандартный раствор альбумина, мл	0,9%-ный раствор натрия хлорида, мл	Содержание белка в пробе, г	Концентрация белка, %
1	0,4	0,6	0,04	4
2	0,6	0,4	0,06	6
3	0,8	0,2	0,08	8
4	1,0	—	0,10	10

Из каждого (из 4) разведения в 5 пробирок вносят по 0,01 мл раствора альбумина и обрабатывают, как и сыворотку крови.

Измерения оптической плотности стандартных растворов начинают с раствора наименьшей концентрации. По полученным средним данным из 5 определений строят калибровочную кривую. Калибровочную кривую проверяют периодически.

Примечания. 1. Содержание белка в стандартном растворе должно быть не менее 7%. 2. При содержании белка в сыворотке больше 10% последнюю разводят физиологическим раствором 1:1, результат умножают на два. Ошибка метода ±2%.

Клиническое значение см. в предыдущем методе.

Источники: 73, 83.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ СЫВОРОТКИ КРОВИ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА НА ПЛЕНКАХ ИЗ АЦЕТАТА ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

Принцип. Белки сыворотки крови разделяют методом электрофореза с использованием в качестве носителя пленок из ацетата целлюлозы.

Реактивы. 1. 5,5-диэтилбарбитуровой кислоты натриевая соль (мединал).

2. Лимонная кислота (ч. д. а., х. ч.).

3. Барбиталцитратный (мединалцитратный) буфер, pH 8,6. 7,36 г 5,5-диэтилбарбитурата натрия, 0,3 г лимонной кислоты растворяют в 700 мл дистиллированной воды в мерной колбе на 1 л, проверяют pH и доводят дистиллированной водой до метки.

4. Бромфеноловый синий водорастворимый, индикатор (ч. д. а.).

5. Ртуть двухлористая (сулема, хлорная ртуть) (ч. д. а.).

6. Уксусная кислота ледяная (х. ч.).

7. Пунцовый С.

8. Кислотный красный 2 Ж (отечественного производства).

9. Трихлоруксусная кислота (ч.) — 50 г/л раствора.

10. Растворы для окрашивания: а) раствор бромфенолового синего — 0,5 г/л, 10 г двухлористой ртути, 20 мл ледяной уксусной кислоты растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды при нагревании в водяной бане, непрерывно помешивая до полного растворения сулемы; отдельно растворяют 0,5 г бромфенолового синего в дистиллированной воде. Оба раствора смешивают, помещают в мерную колбу на 1 л и доводят дистиллированной водой до метки; б) раствор пунцового С — 0,3 г краски растворяют в 100 мл 50 г/л раствора трихлоруксусной кислоты; в) раствор кислотного красного 2 Ж — 0,3 г краски растворяют в 100 мл 50 г/л раствора трихлоруксусной кислоты.

11. Отмывающий раствор — уксусная кислота, 50 г/л раствора.

12. Просветляющий раствор: а) вазелиновое масло; б) смесь ледяной уксусной кислоты и ацетона (1:1).

Оборудование. Прибор для электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы; пленки из ацетата целлюлозы; денситометр.

Ход определения. 1. Подготовка прибора. В соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора заполняют камеры прибора буферным раствором. Следят, чтобы уровень буфера был одинаковым в обеих камерах, а мостик, разделяющий камеры, был сухим.

2. Подготовка пленок из ацетата целлюлозы. Смачивают пленки буферным раствором (помещают в буферный раствор на 5 мин). Удаляют избыток влаги фильтровальной бумагой. Закрепляют пленку матовой стороной кверху (пленки располагают параллельно друг другу и строго параллельно стенкам прибора; нельзя, чтобы они провисали). Закрывают камеру крышкой и пропускают ток напряжением 150 В в течение 5 мин.

3. Нанесение сыворотки крови. На катодный край пленки наносят 1—4 мкл сыворотки в виде узкой полоски так, чтобы полоска не доходила до края пленки.

4. Проведение электрофореза. Включают ток и проводят электрофоретическое разделение в течение 20 мин при напряжении 150 В и силе тока 1 мА на 1 см полоски.

5. Обработка пленок. Выключают ток, вынимают пленки, высушивают их вначале на воздухе 5—10 мин, затем для фиксации в сушильном шкафу при 100°С 10 мин. Окрашивают одним из указанных составов в течение 15 мин, после чего пленки несколько раз (3—4 раза) отмывают от избытка красителя 50 г/л раствором уксусной кислоты до исчезновения фона. Отмытые пленки просушивают фильтровальной бумагой, высушивают на воздухе и просветляют.

Расчет. Измерение проводят на денситометре. Результаты выражают в процентах.

Примечания. 1. Можно использовать барбиталовый (мединал-вероналовый) буфер того же состава, что и для электрофореза на бумаге. Мединал-вероналовый буфер pH 8,6: 10,32 г мединала (натриевая соль веронала) растворяют в химическом стакане (емкостью 500 мл) с дистиллированной водой. После растворения мединала сюда же прибавляют 1,84 г веронала и, помешивая, нагревают на водяной бане до его растворения. Раствор охлаждают до комнатной температуры и переносят в мерную колбу емкостью 1000 мл. Химический стакан несколько раз ополаскивают дистиллированной водой, сливая ее также в мерную колбу. Остывший раствор добавляют до метки и определяют pH. 2. После проведения электрофореза буфер из катодной и анодной камер смешивают, что позволяет использовать его несколько раз. 3. Для количественной оценки результатов можно пользоваться денситометром БИАН. При этом наносят большое количество сыворотки и изменяют режим работы, с тем чтобы получить большую длину разгонки.

Клиническое значение. У здоровых животных содержание альбуминов и глобулинов в сыворотке крови (в %) приведено в приложении 6.

Исследование отдельных фракций белка имеет большое значение, так как дает возможность выявить патологию, при которой содержание общего белка сыворотки крови существенно не изменяется.

Снижение альбуминов наблюдают при гепатите, циррозе печени, гепатозе, острых воспалительных процессах, нефрозе, нефрите, токсикозах беременности, злокачественных новообразованиях, голодании, кахексии, острой пневмонии и бронхопневмонии, кетозе, лейкозе, диспепсии телят до наступления дегидратации, А-гиповитаминозе, токсических поражениях печени и т. д. Увеличение содержания альбуминов встречается очень редко и чаще связано с дегидратацией организма.

Уменьшение количества глобулинов (главным образом гамма-глобулинов) отмечают при нефрозе, нефрите, кахексии и некоторых других болезнях, а его увеличение с одновременным снижением альбуминов (диспротеинемия) встречается очень часто.

Увеличение содержания в крови альфа$_2$-глобулинов с уменьшением количества альбуминов наблюдают при остром полиартрите, острых инфекционных болезнях, сепсисе. Выраженное увеличение количества альфа$_2$- и гама-глобулинов с умеренным снижением альбуминов характерно для поздней стадии пневмонии, хронического эндокардита, холецистита, уроцистита, пиелита, токсикоза беременности. Повышение альфа$_2$-, бета-глобулинов при значительном снижении гамма-глобулинов бывает при липоидном и амилоидном нефрозе, нефрите, нефросклерозе, токсикозе беременности, кахексии, злокачественных новообразованиях. Значительное увеличение гамма-глобулинов, умеренное увеличение бета-глобулинов при заметном снижении альбуминов присуще гепатиту, токсическому гепатозу, кетозу, гемолитическим процессам, лейкемиям и злокачественным новообразованиям кровотворного и лимфатического аппарата.

При циррозе печени, коллагенозах и некоторых других болезнях наблюдают значительное снижение альбуминов и заметное увеличение гамма-глобулинов. Для механической желтухи характерны уменьшение уровня альбуминов и умеренное увеличение содержания альфа$_2$-, бета- и гамма-глобулинов.

Источники: 84, 112, 128.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ СЫВОРОТКИ КРОВИ ТУРБИДИМЕТРИЧЕСКИМ (НЕФЕЛОМЕТРИЧЕСКИМ) МЕТОДОМ

Принцип метода заключается в том, что различные белковые фракции сыворотки крови способны осаждаться фосфатными растворами определенной

концентрации. При этом образуется очень мелкая взвесь и раствор мутнеет. По степени мутности растворов, устанавливаемой с помощью фотоэлектроколориметра, судят о концентрации белков в исследуемой пробе.

Реактивы. 1. Основной фосфатный раствор: 33,5 г едкого натра растворяют в 400 мл дистиллированной воды, добавляют 226,8 г фосфорнокислого калия однозамещенного. После растворения охлаждают до комнатной температуры и добавляют дистиллированную воду до объема 500 мл.

2. Рабочие фосфатные растворы. Из основного фосфатного раствора берут в мерные колбы на 100 мл: 92,4 мл (№ 1), 74,9 мл (№ 2), 58,8 мл (№ 3), 48,7 мл (№ 4) и доводят дистиллированной водой до метки. Тщательно размешивают путем встряхивания. При хранении разведенных растворов, чтобы предупредить бактериальное загрязнение, добавляют по 1 капле хлороформа на 100 мл раствора.

Оборудование. Фотоэлектроколориметр; химические пробирки; пипетки на 1, 2, 5 и 10 мл; бюретка на 100 мл; мерные колбы на 100 и 500 мл.

Ход определения. На каждую пробу сыворотки крови в штатив устанавливают по 6 пробирок, обозначив их цифрами 0, 1, 2, 3, 4 и 5. В пробирку № 0 вносят 10 мл дистиллированной воды, в пробирки № 1, 2, 3, 4 — по 5 мл соответствующих рабочих фосфатных растворов, в пробирку № 5 — 0,5 мл сыворотки крови, 0,75 мл дистиллированной воды и 3,75 мл основного фосфатного раствора, закрывают пробкой и перемешивают путем перевертывания ее 5—6 раз. Из пробирки № 5 переносят по 0,5 мл смеси в пробирки № 1, 2, 3, 4 и 1 мл в пробирку № 0. Содержимое пробирок тщательно, но осторожно перемешивают, избегая образования пузырьков воздуха. Через 15 мин определяют на ФЭКе оптическую плотность (Е) растворов при красном светофильтре в кювете толщиной слоя 1 см. Измерение оптической плотности проводят в обратной последовательности: сначала в пробирке № 4, а затем в пробирках № 3, 2 и 1.

Расчет производят по схеме: Е пробирки № 1 минус Е пробирки № 2 равно Е альбуминов; Е пробирки № 2 минус Е пробирки № 3 равно Е альфа-глобулинов; Е пробирки № 3 минус Е пробирки № 4 равно Е бета-глобулинов; Е пробирки № 4 равно Е гамма-глобулинов. Принимая сумму Е альбуминов и Е всех глобулиновых фракций за 100%, вычисляют содержание каждой фракции в относительных процентах. Зная концентрацию общего белка сыворотки крови, можно произвести пересчет в абсолютные величины.

Пример расчета: Е пробирки 1=0,800; Е пробирки 2=0,400; Е пробирки 3=0,300; Е пробирки 4=0,200. Тогда Е альбуминов равно 0,800—0,400=0,400; Е альфа-глобулинов равно 0,400—0,300=0,100; Е бета-глобулинов равно 0,300—0,200=0,100; Е гамма-глобулинов = 0,200.

Относительный процент альбуминов $= \frac{0,400 \cdot 100}{0,800} = 50\%$, альфа-глобулинов $= \frac{0,100 \cdot 100}{0,800} = 12,5\%$; гамма-глобулинов $= \frac{0,200 \cdot 100}{0,800} = 25\%$, бета-глобулинов $= \frac{0,100 \cdot 100}{0,800} = 12,5\%$.

Чтобы облегчить расчет, нулевые знаки в показаниях экстинкции не учитывают. Ошибка метода составляет ±4%. Норма та же, что и при определении фракций белков методом электрофореза.

Клиническое значение то же, что и в предыдущем методе.

Источники: 47, 73.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЧЕВИНЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И МОЧЕ ПО ЦВЕТНОЙ РЕАКЦИИ С ДИАЦЕТИЛМОНООКСИМОМ

Принцип. Мочевина образует с диацетилмонооксимом в присутствии тиосемикарбазида и солей железа в кислой среде окрашенное соединение: интенсивность окраски пропорциональна содержанию мочевины в сыворотке крови или моче.

Реактивы. 1. 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ).

2. 2,5%-ный раствор диацетилмонооксима: 250 мг вещества растворяют в 9,75 мл дистиллированной воды. Реактив стоек.

3. 0,25%-ный раствор тиосемикарбазида (или 0,32%-ный раствор тиосемикарбазида солянокислого). Реактивы устойчивы при хранении в посуде из темного стекла.

4. Основной раствор хлорного железа: 5 г хлорного железа растворяют и доводят дистиллированной водой до 100 мл, затем прибавляют 1 мл концентрированной серной кислоты.

5. Рабочий раствор хлорного железа: 1 мл основного раствора хлорного железа доводят до 100 мл дистиллированной водой, затем добавляют 8 мл концентрированной серной кислоты и 1 мл 85%-ной ортофосфорной кислоты. Хранят в темной посуде. Годен в течение 2 нед.

6. Цветной реактив: к 30 мл рабочего раствора хлорного железа добавляют 20 мл дистиллированной воды, 1 мл 2,5%-ного раствора диацетилмонооксима и 0,25 мл 0,25%-ного раствора тиосемикарбазида. Цветной реактив готовят каждый раз перед употреблением.

7. Стандартный раствор мочевины — 25 мг%. Берут 250 мг мочевины, в сушильном шкафу при 105°С доводят до постоянного веса, растворяют в мерной колбе на 1 л дистиллированной водой. В качестве растворителя можно использовать 0,2%-ный раствор бензойной кислоты (0,2 г кристаллической бензойной кислоты растворяют в 100 мл дистиллированной воды при интенсивном помешивании и нагревании на водяной бане). Стандарт, приготовленный на растворе бензойной кислоты, более стабилен, чем водный. Оба раствора при работе должны давать небольшие колебания экстинкции на ФЭКе. В противном случае готовят новый стандартный раствор.

8. Мочевина (х. ч.).

9. Серная кислота концентрированная (плотность 1,84).

10. Фосфорная кислота орто, 85%-ная.

11. Железо хлорное.

12. Алюминиевая фольга.

Оборудование. Фотоэлектроколориметр; водяная баня; центрифуга; центрифужные пробирки.

Ход определения мочевины в крови. В центрифужную пробирку вносят 0,8 мл дистиллированной воды, 0,2 мл сыворотки крови и 1 мл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Перемешивают и оставляют на 10—20 мин. Центрифугируют 15—20 мин при 3000 об/мин. В чистую пробирку вносят 0,5 мл прозрачной надосадочной жидкости (не взмучивая осадок) и 5 мл цветного реактива. Пробирку закрывают резиновой пробкой, обернутой алюминиевой фольгой, выдерживают в кипящей водяной бане 20 мин (точно) и охлаждают 2—3 мин под струей водопроводной воды. Измерение проводят на фотоэлектроколориметре при длине волны 500—600 нм (зеленый светофильтр) против контроля в кювете с толщиной слоя 1 см не позднее чем через 15 мин после охлаждения.

Контроль ставят, как и опытную пробу, но вместо надосадочной жидкости берут 0,5 мл дистиллированной воды. Одновременно определяют мочевину в стандартной пробе. Стандартную пробу обрабатывают аналогично опытной, но вместо сыворотки берут 0,2 мл стандартного раствора мочевины. Расчет проводят по формуле:

$$X = \frac{E_{оп}}{E_{ст}} \cdot 25,$$

где X — концентрация мочевины, мг%; $E_{оп}$ — экстинкция опытной пробы; $E_{ст}$ — экстинкция стандартной пробы; 25 — концентрация мочевины в стандартном растворе, мг%.

Ошибка метода составляет ±4%.

Ход определения мочевины в моче. Перед определением мочу фильтруют, разводят физиологическим раствором в соотношении 1 : 25 или 1 : 50. Анализ проводят аналогично определению мочевины в сыворотке крови, но вместо сыворотки берут 0,2 мл разведенной мочи. Параллельно так же обрабатывают стандартную пробу.

Расчет проводят по формуле:

$$X = \frac{E_{оп} K}{E_{ст}} \cdot 25,$$

где X — концентрация мочевины (в мг%) в образце мочи; $E_{оп}$ — экстинкция опытной пробы; $E_{ст}$ — экстинкция стандартной пробы; K — коэффициент разведения мочи; 25 — концентрация мочевины в стандартном растворе, мг%.

Если для анализа используют 100 мг%-ный раствор мочевины, то умножают не на 25, а на 100.

Для расчета мочевины в суточном количестве мочи пользуются следующей формулой:

$$X = \frac{C_{ст} E_{оп} a K}{E_{ст} б},$$

где X — количество мочевины в суточной моче, мг; $E_{оп}$ — экстинкция опытной пробы; $E_{ст}$ — экстинкция стандартной пробы; $C_{ст}$ — количество мочевины в стандарте, мг — 0,0125 мг (из расчета 1 мл стандартного раствора содержит 0,25 мг мочевины); a — суточное количество мочи; $б$ — количество мочи, взятое для анализа; K — коэффициент разведения мочи.

Примечания. 1. Из-за неустойчивости окрашенного комплекса мочевины с диацетилмонооксимом и зависимости окраски от условий нагревания не рекомендуют строить калибровочный график. Стандартную пробу определяют параллельно в каждой серии опытов. 2. Экстинкция стандартного раствора мочевины должна быть примерно такой же, как в сыворотке крови или в разведенной моче здоровых животных. 3. При содержании мочевины в сыворотке крови выше 100 мг% сыворотку крови разводят физиологическим раствором, а результаты умножают на коэффициент разведения. 4. При определении содержания мочевины в моче, начиная с величины экстинкции 0,13—0,15, следует увеличить разведение мочи. Для этих целей готовят 100 мг%-ный стандартный раствор мочевины. 5. Пересчет показателей мочевины на содержание азота в мочевине проводят путем умножения на фактор 0,466.

Клиническое значение. Мочевина является основным конечным продуктом азотистого обмена. Она синтезируется главным образом в печени, а у жвачных, кроме того, в стенке рубца из азота аммиака, аминокислот и амидов. Непосредственный предшественник мочевины в печени — гуанидиновая группировка аминокислоты аргинина. На долю мочевины приходится не менее половины остаточного азота крови и 80—83% мочи.

Выделяется мочевина главным образом почками; у жвачных часть ее поступает в преджелудки со слюной, где она распадается до аммиака и углекислого газа с последующим использованием продуктов распада рубцовой микрофлоры. Концентрация мочевины в крови у здоровых животных колеблется от 20 до 40 мг% (3,33—6,66 мкмоль/л).

Значительное повышение содержания мочевины в крови (уремия) наблюдают при циркуляторной недостаточности почек, в результате чего нарушается фильтрация в клубочках. Такая патология возникает при сердечной недостаточности и дегидратации. Наиболее частой причиной уремии являются заболевания, при которых поражаются почечные клубочки (хронический нефрит, пиелонефрит, нефроз), происходит закупорка мочевыводящих путей камнями и нарушается отток мочи. Уремией сопровождается почечная недостаточность. Повышение содержания мочевины в крови мы наблюдали при скармливании животным больших количеств зеленых бобовых кормов (вико-овсяная смесь, горохо-овсяная смесь), а резкую уремию (до 200 мг%) — у тяжело больных диспепсией телят. Продукционная гиперазотемия возникает при механических повреждениях тканей, обширных ожогах, лихорадочных состояниях, если идет усиленный распад тканевых белков. Тяжесть уремии связана не с концентрацией самой мочевины (она малотоксична), а с накоплением токсических производных гуанидана — гуанидинянтарной кислоты, метилгуанидина, гуанидилуксусной, гуанидилпропионовой кислот, которые образуются в организме вследствие нарушения синтеза мочевины из аргинина.

Уменьшение содержания мочевины в крови бывает при длительном белковом недокорме, при нарушении мочевинообразовательной функции печени. Такое явление часто встречают у коров с дистрофией печени после переболевания их кетозом.

Источник: 83, 110.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СВОБОДНОГО АМИННОГО АЗОТА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПО МЕТОДУ Г. А. УЗБЕКОВА В МОДИФИКАЦИИ З. С. ЧУЛКОВОЙ

Под свободным аминным азотом (аминазот) понимают азот свободных аминокислот сыворотки (плазмы крови). Общий аминный азот крови включает, кроме азота свободных аминокислот, азот сложных полипептидов и белков. Из существующих методов определения свободного аминазота крови наиболее распространенными являются нингидриновые, один из которых приводится ниже.

Принцип. Аминокислоты при взаимодействии с нингидрином подвергаются окислительному дезаминированию и декарбоксилированию. Нингидрин, восстанавливаясь, вступает в реакцию с продуктами этой реакции — образуется соединение, окрашенное в фиолетовый цвет; интенсивность окрашивания при определенных условиях пропорциональна количеству свободных аминокислот.

Реактивы. 1. 0,04 н. (0,04 моль/л) раствор уксусной кислоты: 0,23 мл ледяной уксусной кислоты (CH_3COOH) на 100 мл воды.

2. 1%-ный водный раствор нингидрина.

Оборудование. Фотоэлектроколориметр; водяная баня; пробирки с меткой на 10 мл.

Ход определения. Исследование проводят поэтапно.

1. Осаждение белков. В центрифужную пробирку вносят 0,5 мл сыворотки крови, 0,5 мл 0,04 н. раствора ледяной уксусной кислоты, закрывают пробкой и помещают в холодную водяную баню, которую доводят до кипения. Пробы прогревают в водяной бане в течение 5 мин (время отмечают с момента закипания). Затем пробирки охлаждают и содержимое их фильтруют.

2. Фильтрование. К содержимому пробирки добавляют 1 мл дистиллированной воды, перемешивают тонкой стеклянной палочкой и фильтруют через гладкий бумажный фильтр. Пробирку и осадок на фильтре промывают еще 2 раза по 1 мл водой, после чего основной фильтрат и промывные воды объединяют в одну пробирку с меткой, соответствующей 10 мл.

3. Цветная реакция с нингидрином. К полученному фильтрату добавляют 0,5 мл 1%-ного водного раствора нингидрина, содержимое пробирки перемешивают и помещают в кипящую водяную баню на 20 мин. После этого пробирку охлаждают в водопроводной воде, оставляют на 5 мин при комнатной температуре и доводят дистиллированной водой до 10 мл (по метке на пробирке). Одновременно ставят контроль на реактивы. К 3 мл дистиллированной воды добавляют 0,5 мл 0,04 н. раствора ледяной уксусной кислоты, 0,5 мл 1%-ного водного раствора нингидрина, перемешивают, прогревают на кипящей водяной бане в течение 20 мин, охлаждают под струей водопроводной воды и доводят дистиллированной водой до 10 мл. В качестве контроля можно пользоваться обычной дистиллированной водой.

4. Колориметрия. Оптическую плотность пробы измеряют на ФЭКе при длине волны 536 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 5 мм против контроля или дистиллированной воды.

5. Расчет. По калибровочной кривой, построенной по азоту аланина или другой какой-либо аминокислоты с известным содержанием азота (кроме триптофана, лизина, цистина), находят количество мкг азота, соответствующее полученным значениям экстинкций.

Для перевода результатов в мг% найденное количество мкг азота умножают на 200 и делят на 1000, то есть умножают на 0,2 (в случае если берут 0,5 мл сыворотки).

Пример. Экстинкция пробы составляет 0,212, а мкг азота по прилагаемой градуировочной таблице — 16,42. Отсюда концентрация аминного азота представляет величину: $16{,}42 \cdot 0{,}2 = 3{,}284$ мг%. Аналогичный результат можно

получить при следующей пропорции: 0,5 мл сыворотки — 16,42 мкг, 100 мл сыворотки — X, где $X = (16{,}42 \cdot 100) : 0{,}5 = 3284$ мкг% = 3,284 мг%.

Клиническое значение. У здоровых животных содержание свободного аминного азота в сыворотке (плазме) крови колеблется от 4 до 8 мг%. Снижается аминазот при длительном недокорме, голодании, нефрозе, хронических расстройствах функций желудочно-кишечного тракта, при жировой дистрофии печени вследствие кетоза. Повышается уровень аминазота в крови после приема богатого протеином корма, при острой токсической дистрофии печени (печеночной коме), отравлении фосфором и другими ядами, лихорадке.

Источник: 47.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЧЕВОЙ КИСЛОТЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПО РЕАКЦИИ С ФОСФОРНОВОЛЬФРАМОВЫМ РЕАКТИВОМ

Для определения мочевой кислоты в сыворотке крови используют колориметрические, энзиматические и другие методы. Наиболее специфическими и точными являются ферментативные (уреазные) методы. Однако выполнять их трудно, поэтому в качестве унифицированного метода в клинико-диагностических целях используют фосфорновольфрамовый карбонатный метод.

Принцип. Мочевая кислота восстанавливает фосфорновольфрамовый реактив с образованием комплекса голубого цвета. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации мочевой кислоты.

Реактивы. 1. Серная кислота 0,7 н. (0,35 моль/л), ч. д. а. К 200 мл дистиллированной воды добавляют 10 мл концентрированной серной кислоты и доводят объем до 500 мл.

2. Натрий вольфрамовокислый, двухводный ($Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$), ч. д. а., 100 г/л. Растворяют 50 г вольфрамовокислого натрия в небольшом количестве дистиллированной воды и доводят водой до 500 мл.

3. Натрий углекислый (Na_2CO_3), ч. д. а., 103 г/л. Растворяют 51,5 г углекислого натрия в небольшом количестве дистиллированной воды и доводят водой до 500 мл.

4. Ортофосфорная кислота 85%, ч. д. а.

5. Литий сернокислый ($Li_2SO_4 \cdot H_2O$), ч. д. а.

6. Литий углекислый (Li_2CO_3), ч. д. а.

7. Фосфорновольфрамовый реактив. В круглодонную колбу на 1,5 л вносят 40 г вольфрамовокислого натрия и 300 мл дистиллированной воды. Добавляют 32 мл 85%-ной ортофосфорной кислоты и несколько стеклянных бусинок. Осторожно кипятят 2 ч на песочной или глицериновой бане с обратным холодильником. Охлаждают до комнатной температуры и доливают дистиллированной водой так, чтобы общий объем был 1 л. Добавляют 32 г сернокислого лития. Раствор стабилен при хранении в холодильнике.

8. Мочевая кислота, имп.

9. Формалин, не менее 36,5—37,5%, фармакопейный.

10. Основной калибровочный раствор мочевой кислоты, 1 г/л. Растворяют 0,6 г углекислого лития в 150 мл дистиллированной воды, фильтруют и нагревают до 60°С. Взвешивают 1 г мочевой кислоты, вносят в предварительно нагретую мерную колбу на 1 л, вливают теплый раствор углекислого лития и быстро встряхивают. После растворения мочевой кислоты колбу охлаждают до комнатной температуры, добавляют 20 мл раствора формалина, наливают 300—350 мл дистиллированной воды. Добавляют несколько капель раствора метилового оранжевого, затем, встряхивая, медленно добавляют 20—22 мл 0,35 моль/л серной кислоты до изменения цвета в розовый. Доливают колбу до метки дистиллированной водой. Раствор стабилен при хранении в холодильнике в посуде из темного стекла. 1 мл раствора содержит 1 мг мочевой кислоты.

11. Рабочий калибровочный раствор мочевой кислоты. 1 мл основного калибровочного раствора доводят до 200 мл дистиллированной водой. 1 мл содержит 0,005 мг мочевой кислоты. Стабилен в течение 2 нед при хранении в холодильнике.

Оборудование. Баня песочная или глицериновая; обратный холодильник; фотоэлектроколориметр.

Ход определения. Для опытной пробы к 8 мл дистиллированной воды добавляют 1 мл сыворотки, 0,5 мл 0,35 моль/л серной кислоты и перемешивают. Затем добавляют 0,5 мл раствора вольфрамовокислого натрия и тщательно перемешивают. Через 5—10 мин фильтруют. К 3 мл фильтрата добавляют 1,5 мл раствора углекислого натрия, перемешивают. Затем добавляют 1 мл фосфорновольфрамового реактива, перемешивают, переворачивая пробирку. Через 30 мин измеряют на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 590—700 нм (красный светофильтр) против холостой пробы.

Холостую пробу ставят, как и опытную, но вместо фильтрата берут 3 мл дистиллированной воды.

Калибровочную пробу ставят и измеряют, как и опытную, но вместо фильтрата берут 3 мл рабочего калибровочного раствора.

Расчет ведут по формуле:

$$\text{концентрация мочевой кислоты (ммоль/л)} = \frac{E_{оп} C_к \cdot 10}{E_к} \cdot K = \frac{E_{оп} \cdot 5 \cdot 0{,}059}{E_к},$$

где $E_{оп}$ — экстинкция опытной пробы; $E_к$ — экстинкция калибровочной пробы; $C_к$ — концентрация рабочего калибровочного раствора в мг в 1 мл (0,5); 10 — пересчет на сыворотку (в опытную пробу берут 0,3 мл сыворотки, то есть в 10 раз меньше, чем в калибровочную пробу); K — коэффициент пересчета в единицы СИ мг/100 мл в ммоль/л равен 10 : 168,1 = 0,059 (10 — пересчет на 1 л сыворотки, 168,1 — относительная молекулярная масса мочевой кислоты).

При пересчете единиц СИ в мг% полученную величину делят на 0,059 или умножают на 16,94. Например, найденная величина мочевой кислоты составила 0,24 ммоль/л, что соответствует 4,06 мг%.

Клиническое значение. Мочевая кислота у человека, свиней и птиц является конечным продуктом обмена пуриновых нуклеиновых оснований. У лошадей, собак и кроликов мочевая кислота окисляется с образованием аллантоина; она плохо растворима в воде, ее соли — ураты откладываются в суставах и мочевыводящих путях, вызывая подагру и мочекаменную болезнь.

Повышенное содержание мочевой кислоты наблюдают при мочекаменной болезни, поражении клубочков почек (острый и хронический нефрит), при подагре, усиленном распаде нуклеопротеидов (лейкозах, гемолитической желтухе, голодании, пневмонии).

Источники: 79, 84.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КРЕАТИНИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПО ЦВЕТНОЙ РЕАКЦИИ ЯФФЕ (МЕТОД ПОППЕРА)

Принцип. Креатинин реагирует с пикриновой кислотой в щелочной среде с образованием окрашенных соединений. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации креатинина.

Реактивы. 1. Насыщенный раствор пикриновой кислоты. Товарная пикриновая кислота содержит 15—20% влажности. Кислоту не сушат! Взрывоопасна! 2 г пикриновой кислоты растворяют в 100 мл горячей (70—80°С) дистиллированной воды (при нагревании в водяной бане). После этого раствор оставляют на 24 ч, периодически перемешивая, а затем фильтруют. Реактив стоек. Хранят в темной посуде.

2. Основной стандартный раствор креатинина. 100 мг креатинина растворяют в 100 мл 0,1 н. (0,1 моль/л) раствора соляной кислоты, хранят в холодильнике в посуде с притертой пробкой. Для определения креатинина сыворотки крови рабочий стандартный раствор получают разведением основного раствора дистиллированной водой в 100 раз. 1 мл раствора содержит 0,01 мг креатинина (1 мг%).

3. 10%-ный раствор едкого натра.

4. 0,1 н. (0,1 моль/л) раствор соляной кислоты.

Оборудование. Фотоэлектроколориметр; водяная баня; колбы мерные.

Ход определения. 2 мл сыворотки смешивают с 6 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты. Через 5 мин пробирку помещают на 15—20 с в кипящую водяную баню, а потом центрифугируют. К 4 мл центрифугата добавляют 0,2 мл 10%-ного раствора едкого натра и тщательно смешивают. Иногда после подщелачивания раствор мутнеет вследствие выпадения фосфатов. В этом случае раствор еще раз центрифугируют. Затем раствор доводят до объема 10 мл дистиллированной водой. Через 10 мин измеряют на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 2 см при длине волны 500—560 нм (зеленый светофильтр) против контроля.

Контроль — 3 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты и 0,2 мл 10%-ного раствора едкого натра доводят до объема 10 мл дистиллированной водой. Стандартную пробу обрабатывают точно так же, как и опытную, с той лишь разницей, что вместо сыворотки берут 2 мл рабочего (1 мг%) раствора стандарта; пробу при этом не центрифугируют. Стандартную пробу можно готовить так: к 1 мл рабочего стандартного раствора креатинина добавляют 3 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты, 0,2 мл 10%-ного раствора едкого натра и 5,8 мл дистиллированной воды.

Расчет концентрации креатинина производят по формуле:

$$X = \frac{E_{оп}}{E_{ст}} \cdot 1,$$

где X — содержание креатинина в сыворотке, мг%; $E_{оп}$ — экстинкция опытной пробы; $E_{ст}$ — экстинкция стандартной пробы; 1 — концентрация креатинина в стандартной пробе, мг%.

Клиническое значение. У здоровых сельскохозяйственных животных содержание креатинина в сыворотке крови колеблется от 0,45 до 1,8 мг%, у кур — от 1,4 до 4 мг%.

В организме креатинин образуется из креатина (метилгуанидинуксусной кислоты) в результате дегидратации. Содержится креатинин в основном в мышечной ткани, его количество в крови относительно постоянно. Повышается концентрация креатинина в крови при почечной недостаточности, прогрессирующих диффузных заболеваниях почек, закупорке мочевых путей, кишечной непроходимости, механической желтухе, голодании, мышечной дистрофии. Понижение количества креатинина не имеет клинического значения.

Источники: 83, 84.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИЛИРУБИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПО ДИАЗОРЕАКЦИИ (МЕТОД ИЕНДРАШИКА, КЛЕГГОРНА И ГРОФА)

Принцип. При взаимодействии сульфаниловой кислоты с азотнокислым натрием образуется диазофенилсульфоновая кислота, которая дает со связанным (прямым) билирубином сыворотки крови розово-фиолетовое окрашивание. По интенсивности окрашивания определяют концентрацию билирубина. При добавлении к сыворотке крови кофеинового реактива несвязанный (непрямой) билирубин переходит в растворимое диссоциированное состояние и со смесью диазореактивов также дает розово-фиолетовое окрашивание. По интенсивности окрашивания определяют концентрацию общего билирубина. Разница между общим и связанным билирубином покажет концентрацию несвязанного билирубина.

Реактивы. 1. Кофеиновый реактив. 5 г чистого кофеина, 7,5 г бензойнокислого натрия, 12,5 г уксуснокислого натрия ($C_2H_3O_2Na \cdot 3H_2O$) растворяют в 90 мл дистиллированной воды, нагревают до 50—60°С, хорошо перемешивают. После охлаждения доводят дистиллированной водой до 100 мл. Срок хранения 2 нед.

2. 0,9%-ный раствор хлористого натрия.

3. Диазосмесь: а) диазореактив 1: 5 г сульфаниловой кислоты растворяют при нагревании в 300—400 мл дистиллированной воды, прибавляют 15 мл концентрированной соляной кислоты (плотность 1,19). Если сульфаниловая кислота полностью не растворяется, колбу помещают в теплую воду и помешивают. Только после полного растворения сульфаниловой кислоты и охлаждения рас-

твора доливают дистиллированной водой до 1 л. Реактив стойкий, хранят в посуде из темного стекла; б) диазореактив 2: 0,5%-ный раствор азотистокислого натрия ($NaNO_2$). Хранят в посуде из темного стекла 2—3 нед. Первый признак его непригодности — желтоватый оттенок. Перед работой смешивают 10 мл диазореактива 1 и 0,3 мл диазореактива 2.

Оборудование. Фотоэлектроколориметр; колбы мерные.

Ход определения. В три пробирки (для общего и прямого билирубина, а также для контроля) вносят реактивы по следующей схеме: для общего билирубина — сыворотки 0,5 мл, кофеинового реактива 1,75 и диазосмеси 0,25 мл; для прямого билирубина — сыворотки 0,5 мл, физраствора 1,75 и диазосмеси 0,25 мл; для контроля — сыворотки 0,5 мл, кофеинового реактива 1,75 и физраствора 0,25 мл.

Для определения прямого билирубина колориметрирование проводят спустя 5—10 мин после добавления диазосмеси, так как при длительном стоянии в реакцию вступает непрямой билирубин. Для общего билирубина пробу для проявления окраски оставляют на 20 мин, после чего колориметрируют. При дальнейшем стоянии окраска не изменяется. Измеряют на ФЭКе при длине волны 500—560 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 0,5 см, против воды. Из показателей, полученных при колориметрировании общего и прямого билирубина, вычитают показатель контроля.

Расчет проводят по калибровочному графику. Находят содержание общего и прямого билирубина. Для определения уровня непрямого билирубина вычитают из показателя общего его содержания показатель прямого билирубина.

Построение калибровочного графика. Метод 1. Метод Schellong u Wende (1960) с использованием стабилизирующего свойства белка сыворотки крови.

Реактивы для построения калибровочного графика.

1. Основной стандартный раствор билирубина. Препараты кристаллического билирубина отличаются по своим свойствам. Не каждый билирубин пригоден для калибровочного графика. Допустимым является лишь тот билирубин, 1 мг% растворов которого при соединении с хлороформом (для наркоза) при 25°С дает на спектрофотометре абсорбцию от 1,01 до 1,07 при длине волны 453 нм в кювете с толщиной слоя 1 см. В колбу на 50 мл помещают 40 мг (80 мг%) билирубина (продажный билирубин — непрямореагирующий) и 30—35 мл 0,1 моль/л раствора углекислого натрия (10,6 г безводного Na_2CO_3 доводят до 1 л дистиллированной водой). Хорошо взбалтывают, не допуская образования пузырьков. Доводят до 50 мл 0,1 моль/л раствором Na_2CO_3 и несколько раз перемешивают. Раствор стоек только в течение 10 мин от начала приготовления. В дальнейшем билирубин окисляется.

2. Рабочий раствор билирубина. К 13,9 мл свежей негемолизированной сыворотки крови добавляют 2 мл свежеприготовленного 80 мг%-ного раствора билирубина и 0,1 мл 4 н. (4 моль/л) раствора уксусной кислоты (25 мл ледяной уксусной кислоты доводят до 100 мл дистиллированной водой). Хорошо перемешивают. При этом выделяются пузырьки углекислого газа. Рабочий раствор стоек в течение нескольких дней. Этот раствор содержит на 10 мг% билирубина больше, чем сыворотка, взятая для приготовления раствора. Чтобы исключить при расчетах количество билирубина, содержащегося в сыворотке крови, при измерении на ФЭКе из величин экстинкции стандартных проб вычитают величины экстинкции соответствующих разведений компенсационной жидкости.

Для приготовления компенсационной жидкости смешивают 13,9 мл той же сыворотки, которая использовалась для приготовления стандарта билирубина, 2 мл 0,1 моль/л раствора Na_2CO_3 и 0,1 мл 4 моль/л раствора уксусной кислоты.

Для построения калибровочного графика готовят ряд разведений с различным содержанием билирубина (табл. 6).

К полученным разведениям прибавляют по 1,75 мл кофеинового реактива и по 0,25 мл диазосмеси. При появлении помутнения можно добавить по 3 капли 30%-ного раствора едкого натра. Измерение проводят, так же как и в опытных пробах, через 20 мин. Из компенсационной жидкости готовят разведения, аналогичные стандартным (как указано в табл. 6), и далее обрабатывают их так же, как стандартные пробы.

Метод 2. Калибровочный график строят по готовому набору реактивов: билирубин-эталон лиофилизированный, выпускаемый фирмой «Лахема» (ЧССР).

6. Разведения билирубина для построения калибровочного графика

№ пробирки	Рабочий раствор билирубина, мл	0,9 %-ный раствор хлористого натрия, мл	Количество билирубина в пробе, мг	Концентрация билирубина, мг% в сыворотке крови
1	0,05	0,45	0,005	1
2	0,10	0,40	0,010	2
3	0,15	0,35	0,015	3
4	0,20	0,30	0,020	4
5	0,25	0,25	0,025	5

Набор Био-Ла-Тест «Билирубин-эталон» состоит из билирубина лиофилизированного и альбумина лиофилизированного. Построение калибровочной кривой с использованием «Билирубин-эталона» проводят по инструкции, прилагаемой к набору реактивов.

Примечания. 1. Сыворотка крови не должна быть гемолизирована. 2. В качестве стандарта лучше использовать билирубин, выпускаемый фирмами «Лахема» (ЧССР) и «Марк» (ФРГ). 3. Завод «Реагент» (Рига) производит наборы для определения билирубина в сыворотке крови по описанному выше методу.

Клиническое значение. Билирубин — желчный пигмент, образуется в клетках ретикулоэндотелиальной системы из гемоглобина разрушенных эритроцитов. Билирубин ядовит, нерастворим в воде и не выделяется почками. В плазме крови он образует непрочный комплекс с альбумином, благодаря чему токсичность его снижается. Связанный с альбумином билирубин реагирует с диазореактивом лишь в присутствии кофеина или другого вещества, ускоряющего реакцию. Такой билирубин называют свободным или непрямым (неконъюгированным). Выводится из организма он через печень. В печени происходят экстракция билирубина из комплекса с альбумином и соединение (конъюгирование) его с глюкуроновой кислотой. Соединения билирубина с глюкуроновой кислотой — моно- и диглюкорониды растворимы в воде и непосредственно реагируют с диазореактивом. В этих соединениях заключен так называемый прямой связанный билирубин, который выделяется в желчь и поступает в кишечник, где превращается в уробилиноген.

В сыворотке крови здоровых животных содержится только непрямой билирубин. Его уровень колеблется от 0,01 до 1,60 мг% (приложение 6). Прямой билирубин обнаруживают при болезнях печени и ее выводящих путей.

Повышенное содержание непрямого (свободного) билирубина в сыворотке крови отмечают при гемолитической желтухе. Увеличение содержания прямого (связанного) и в меньшей степени непрямого билирубина в сыворотке крови наблюдают при инфекционном и токсическом гепатите, циррозе печени, механической желтухе.

Источник: 70.

КОЛЛОИДНО-ОСАДОЧНЫЕ ПРОБЫ

Для оценки функции печени и некоторых других патологических состояний широко используют коллоидно-осадочные (коагуляционные) пробы, с помощью которых устанавливают изменения в составе белков сыворотки крови (диспротеинемию). В основе осадочных проб лежит взаимодействие глобулинов с веществами-осадителями. Осадочные пробы не являются специфическими, однако они позволяют устанавливать степень нарушения соотношений между альбуминами и глобулинами сыворотки. Положительные коллоидно-осадочные пробы чаще обусловлены увеличением содержания глобулинов или уменьшением содержания альбуминов. Ускорение коллоидно-осадочных реакций наблюдают также вследствие увеличения грубодисперсных белков — гамма-глобулинов при нормальном коэффициенте альбуминов (глобулинов).

Из множества коллоидно-осадочных проб чаще пользуются сулемовой пробой, пробой Вальтмана, тимоловой пробой, пробой с сульфатом меди, тиосульфатной пробой, кадмиевой пробой и др. Обычно применяют одновременно несколько осадочных проб.

Источник: 70.

СУЛЕМОВАЯ ПРОБА

Принцип. Сулема в присутствии мелкодисперсных коллоидов (белков) образует коллоидный раствор солей ртути. Нарушение дисперсности белковых фракций сыворотки крови вызывает осаждение грубодисперсных частиц.

Реактивы. 1. 0,1%-ный раствор сулемы (готовят из кристаллической сулемы).

2. 0,85%-ный раствор хлорида натрия.

Оборудование. Микробюретки; маленькие стаканчики (или пробирки).

Ход определения. В стаканчик (пробирку) вносят 0,5 мл сыворотки крови и 1 мл 0,85%-ного раствора хлорида натрия, перемешивают. Из микробюретки добавляют 0,1%-ный раствор сулемы — сначала умеренно до появления первоначального обратимого помутнения, а уже после этого медленно по каплям (с интервалом 20—30 с) до стойкого помутнения (через вертикальный слой жидкости нельзя прочитать газетный текст). Результат данной пробы (реакции) выражают в количестве миллилитров раствора сулемы, пошедшего на титрование.

В норме у здоровых коров и нетелей на титрование сыворотки идет 1,6—2,6 мл 0,1%-ного раствора сулемы. Снижение показателя до 1,5 мл и менее отмечают при дистрофии печени вследствие кетоза и других причин. Чем тяжелее дистрофия печени, тем меньше идет на титрование раствора сулемы. Положительную сулемовую пробу регистрируют при гепатите, циррозе печени.

Источник: 70.

ПРОБА ВАЛЬТМАНА

Принцип. При добавлении к сыворотке крови раствора хлористого кальция в нагретом состоянии происходит нарушение коллоидной устойчивости сыворотки.

Реактивы. 0,5%-ный раствор хлористого кальция. Готовят из 10%-ного раствора хлористого кальция ($CaCl_2 \cdot 6H_2O$), что соответствует 5%-ному раствору безводного хлористого кальция. Точно определить массу хлористого кальция невозможно из-за его гигроскопичности, поэтому концентрацию раствора хлористого кальция определяют по плотности (удельному весу). Так, 5%-ный раствор хлористого кальция имеет плотность 1,040.

Для приготовления 10%-ного раствора хлористого кальция 99,14 г $CaCl_2 \times 6H_2O$ доводят до 1 л бидистиллированной водой и измеряют плотность, доводят до 1,040. Из полученного раствора путем разведения в 10 раз готовят 0,5%-ный раствор хлористого кальция.

Приготовление 0,5%-ного раствора хлористого кальция из ампулированного раствора хлористого кальция: если плотность ампулированного раствора хлористого кальция 1,040, то для получения 0,5%-ного раствора ампулированный разводят в 10 раз.

Оборудование. Спиртовка или газовая горелка; держатели для пробирок; колбы мерные.

Ход определения. К 0,1 мл сыворотки добавляют 4,9 мл воды, перемешивают путем опрокидывания пробирки и прибавляют 0,1 мл 0,5%-ного раствора хлористого кальция из пипетки на 1 мл. Содержимое пробирки встряхивают и нагревают над пламенем спиртовки или горелки до однократного закипания смеси. Охлаждают пробирку и смотрят на свету. Если хлопьев нет, то в эту же пробирку добавляют еще 0,1 мл 0,5%-ного раствора хлористого кальция и вновь доводят до кипения. Процедуру повторяют, пока не выпадут хлопья. Результаты оценивают, подсчитывая общее количество пошедшего на реакцию 0,5%-ного раствора хлористого кальция.

Примечание. Сыворотка не должна быть гемолизированной, храниться не более 24 ч от момента взятия крови. В норме (у человека) коагуляция наступает при прибавлении 0,4—0,5 мл раствора хлористого кальция. При острых и воспалительных процессах коагуляция проявляется быстрее (укорочение ленты Вальтмана), а при подострых и хронических воспалительных и пролиферативных процессах, а также при циррозе печени — медленнее (удлинение ленты Вальтмана).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА

Состояние углеводного обмена оценивают по содержанию в крови глюкозы, молочной и пировиноградной кислот, гликогена и других веществ. Применяют методы нагрузки глюкозой, фруктозой, галактозой, пробы с инсулином, адреналином и т. д. В сочетании с другими клиническими лабораторными показателями они имеют определенное диагностическое значение.

Источники: 73, 94.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ В КРОВИ, МОЧЕ ПО ЦВЕТНОЙ РЕАКЦИИ С ОРТО-ТОЛУИДИНОМ

Принцип. Глюкоза при нагревании с орто-толуидином в растворе уксусной кислоты дает окрашенное соединение, интенсивность которого пропорциональна концентрации глюкозы.

Реактивы. 1. Орто-толуидин (ч.) желтого цвета, обязательно подлежит перегонке в колбе-реторте при температуре 200°С (на песочной бане). Свежеприготовленный орто-толуидин должен быть бесцветным или слабо-желтого цвета. Экстинкция при 590—655 нм против воды не должна превышать 0,02. Реактив стоек при хранении в посуде темного стекла без доступа воздуха.

2. Ледяная уксусная кислота (х. ч.).

3. 20%-ный раствор трихлоруксусной кислоты.

4. Тиомочевина (ч. д. а.).

5. 0,2%-ный раствор бензойной кислоты: 0,2 г кристаллической бензойной кислоты растворяют в 99,8 мл дистиллированной воды. Для более быстрого растворения нагревают на водяной бане.

6. Орто-толуидиновый реактив: в 94 мл ледяной уксусной кислоты растворяют 0,15 г тиомочевины и добавляют 6 мл орто-толуидина; стоек при хранении в холодильнике.

7. Стандартный раствор глюкозы, 50 мг%. 50 мг глюкозы, высушенной в сушильном шкафу до постоянной массы при температуре 100°С, растворяют в 100 мл 0,2%-ного раствора бензойной кислоты. Бензойная кислота увеличивает стабильность стандартного раствора глюкозы. Можно пользоваться водным раствором глюкозы, однако время хранения такого стандарта значительно меньше. Экстинкция стандарта не должна давать резких колебаний, в противном случае необходимо готовить новый стандарт. Хранят стандартный раствор в холодильнике.

Оборудование. Фотоэлектроколориметр; колба-реторта; песочная баня; водяная баня; термос на 3—5 л; пробирки центрифужные.

Определение глюкозы в крови. *Подготовка безбелкового фильтрата крови.* В центрифужную пробирку вносят 5 мл 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, 5 мл цельной крови и перемешивают. Готовят все на месте в момент взятия крови у животных. Пробирки помещают в термос со льдом. В лаборатории пробирки центрифугируют 20—30 мин при 2000—3000 об/мин. Верхний слой (безбелковый фильтрат) сливают в другую пробирку и в нем определяют глюкозу. (Можно, кроме того, определять неорганический фосфор и магний.) Хранят безбелковый фильтрат крови в холодильнике не более 5 дней.

Проведение анализа. В пробирку вносят 0,2 мл безбелкового фильтрата крови, 0,3 мл дистиллированной воды и 4,5 мл орто-толуидинового реактива. Пробирку помещают в кипящую водяную баню на 8 мин (точно!). Вода должна непременно кипеть. После этого сразу охлаждают до комнатной температуры под водопроводной водой. Фотометрируют на ФЭКе при длине волны 580—

650 нм (оранжевый или красный светофильтр) в кювете с толщиной слоя 10 мм против контроля.

Контроль: 0,4 мл 20%-ной трихлоруксусной кислоты, 0,6 мл дистиллированной воды, 9 мл орто-толуидинового реактива (на две кюветы). Параллельно готовят стандартную пробу. Стандартные пробы ставят, как опытные, но вместо безбелкового фильтрата крови берут 0,1 мл раствора глюкозы с концентрацией 50 мг%, 0,1 мл 20%-ного раствора ТХУ, 0,3 мл дистиллированной воды и 4,5 мл орто-толуидинового реактива.

Расчет ведут по формуле:

$$C_{оп} = \frac{E_{оп}}{E_{ст}} \cdot 50 = мг\ \%,$$

где $C_{оп}$ — концентрация глюкозы в пробе, мг%; $E_{оп}$ — оптическая плотность пробы; $E_{ст}$ — оптическая плотность стандарта; 50 — коэффициент для пересчета в мг% (стандартный раствор содержит 50 мг% глюкозы).

Определение глюкозы в моче. После проведения качественной пробы на содержание глюкозы в моче, в зависимости от характера реакции, разводят мочу в 2—10 раз. 0,1 мл разведенной мочи смешивают с 4,5 мл орто-толуидинового реактива и далее обрабатывают и измеряют, как указано при определении глюкозы в крови. При расчете результатов соответственно надо учитывать разведение мочи.

Примечания. 1. Калибровочный график строить не рекомендуется, так как интенсивность окраски проб зависит от условий опыта. Поэтому правильнее обрабатывать стандартные пробы одновременно с опытными и вести расчет по формуле. 2. При исследовании крови свиней и лошадей целесообразно готовить стандартный раствор с содержанием 100 мг% глюкозы. В этом случае коэффициент для пересчета будет не 50, а 100. 3. Для снижения скорости гликолиза целесообразно к крови или моче добавлять фтористый натрий в количестве 5—10 мг/мл.

Клиническое значение. Глюкоза — основной источник энергии для многих клеток организма. На ее долю приходится более 90% всех низкомолекулярных углеводов. Относительно постоянный уровень глюкозы в крови поддерживается в результате сахароснижающего свойства инсулина и сахароповышающего свойства адреналина, глюкагона и глюкокортикоидов. Концентрация глюкозы в плазме и эритроцитах почти одинаковая, она быстро снижается благодаря гликолизу. Поэтому исследование глюкозы в крови осуществляют сразу после ее взятия или проводят осаждение белков трихлоруксусной кислотой непосредственно на ферме. Нормативы сахара (глюкозы) в крови животных приведены в приложении 6.

Гипогликемия (снижение сахара в крови) встречается при кетозе, вторичной остеодистрофии, послеродовом парезе, некоторых формах ожирения, токсических поражениях печени. Часто она является следствием недостатка в кормах легкоусвояемых углеводов, большой потребности в глюкозе при высококонцентратном типе кормления, преобладания в рационах кислых кормов. К гипогликемии приводит передозировка инсулина.

Гипергликемия (повышение сахара в крови) может быть стойкой и непродолжительной. Непродолжительная гипергликемия бывает при скармливании скоту больших количеств сахаристых кормов, а также при испуге, высокой температуре, стрессовом состоянии. Стойкую гипергликемию отмечают при сахарном диабете. Однако если он сопровождается выраженной глюкозурией, то содержание глюкозы в крови может быть в пределах нормы. Обусловливается это понижением почечного порога (ослабление реабсорбции глюкозы в почечных канальцах).

В моче здоровых животных глюкозу, как правило, не обнаруживают. Появляется она в моче (глюкозурия) при сахарном диабете, когда уровень глюкозы в крови превышает пороговую концентрацию. У человека почечный порог глюкозы в крови около 150 мг% (около 8 ммоль/л). При склерозе сосудов клубочков почек из-за ослабления реабсорбции глюкозы, несмотря на гипергликемию, глюкозурия слабо выражена.

Источник: 73

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПИРОВИНОГРАДНОЙ КИСЛОТЫ ПО МОДИФИЦИРОВАННОМУ МЕТОДУ ФРЕЕДМАН И ХАУГЕН

Принцип. Пировиноградная кислота при добавлении 2,4-динитрофенилгидразина превращается в 2,4-динитрофенилгидрозон пировиноградной кислоты, который очищают от примесей гидрозонов и других кетокислот последовательной экстракцией содовым раствором. 2,4-динитрофенилгидрозон образует со щелочью соединение коричнево-красного цвета; интенсивность окрашивания определяют на фотоэлектроколориметре.

Реактивы. 1. 7,5%-ный раствор трихлоруксусной кислоты. Готовят небольшое количество, хранят в холодильнике. Старые растворы использовать нецелесообразно.

2. Толуол чистый (перегнанный).

3. 0,1%-ный раствор 2,4-динитрофенилгидразина в 2 н. (2 моль/л) растворе соляной кислоты: 100 мл 2,4-динитрофенилгидразина растворяют в 100 мл 2 н. раствора соляной кислоты. Кислоту добавляют небольшими порциями и нагревают на водяной бане до полного растворения 2,4-динитрофенилгидразина. Раствор фильтруют и хранят в холодильнике в склянке из темного стекла.

4. 10%-ный раствор углекислого натрия.

5. 1,5 н. (1,5 моль/л) раствор едкого натра.

6. 2 н. (2 моль/л) раствор соляной кислоты.

7. Основной раствор пировиноградной кислоты: 20 мг пировиноградной кислоты или 25 мг пировиноградного натрия растворяют дистиллированной водой в мерной колбе на 100 мл.

8. Стандартный 1 мг%-ный раствор пировиноградной кислоты. Готовят перед анализом из основного раствора. Берут 5 мл основного раствора пировиноградной кислоты или пировиноградноокислого натрия и в мерной колбе доводят дистиллированной водой до 100 мл.

Оборудование. ФЭК; химические пробирки с притертой пробкой; водяная баня.

Ход определения. 1. Осаждение белков крови. Для получения цельной крови в качестве стабилизатора (антикоагулянта) используют фтористый натрий из расчета 100 мг на 10 мл крови. 3 мл только что взятой стабилизированной крови вносят в центрифужную пробирку, затем медленно (по каплям) прибавляют 3 мл 7,1%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Содержимое пробирки тщательно перемешивают стеклянной палочкой. Пробирку помещают на 10 мин в баню со льдом для лучшего осаждения белка, после чего центрифугируют 3 мин при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость осторожно сливают в чистую пробирку и используют для определения пировиноградной и молочной кислот. Хранят в банке со льдом.

2. Образование 2,4-динитрофенилгидрозона пировиноградной кислоты. В пробирку с притертой пробкой вносят 1 мл безбелкового фильтрата крови, помещают ее в водяную баню при температуре 25° на 10 мин. После этого добавляют 0,25 мл 0,1%-ного раствора 2,4-динитрофенилгидразина. Пробу оставляют на 10 мин при комнатной температуре (для образования гидрозона пировиноградной кислоты).

3. Экстракция 2,4 динитрофенилгидрозона пировиноградной кислоты. К реакционной смеси добавляют 2 мл толуола, пробирку закрывают пробкой и содержимое ее тщательно встряхивают 3 мин. На 10 мин пробу оставляют для расслоения жидкостей. После этого осторожно, с помощью пастеровской пипетки, удаляют нижний водный слой. К толуоловому экстракту добавляют 1,5 мл 10%-ного раствора углекислого натрия и хорошо взбалтывают, снова дают разделиться слоям жидкости. На этом этапе гидрозон пировиноградной кислоты переходит в содовый раствор.

4. Колориметрирование. Из нижнего содового раствора отбирают 1,25 мл и вносят в чистую пробирку, прибавляют 1,25 мл 1,5 н. раствора едкого натра. Получается красно-бурое окрашивание, характерное для 2,4-динитрофенилгидрозона пировиноградной кислоты. Через 20 мин проводят фотометрирование в кювете с толщиной слоя 5 мм при длине волны 465 нм (синий светофильтр) против контроля. Контроль готовят так же, как и опытную пробу, только без

крови. В качестве контроля можно использовать 7,5%-ный раствор трихлоруксусной кислоты.

5. Параллельно (как и пробу с кровью) проводят обработку стандартного раствора пировиноградной кислоты или пировиноградноки́слого натрия, содержащего 1 мг% пировиноградной кислоты.

Расчет:

$$X = \frac{a}{b} \cdot 1,$$

где X — количество пировиноградной кислоты в мг на 100 мг крови; a — экстинкция опытной пробы; b — экстинкция стандартной пробы; 1 — содержание пировиноградной кислоты в стандартной пробе, мг%.

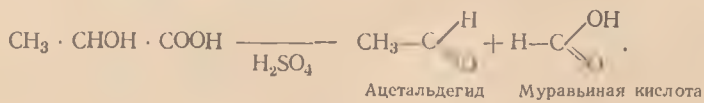
Расчет можно проводить по калибровочной кривой, построенной по стандартному раствору пировиноградной кислоты или пировиноградноки́слого натрия (лития) и содового раствора. Готовят стандартный раствор, содержащий в 1 мл 50 мкг пировиноградной кислоты. Далее берут шесть пробирок и вносят последовательно 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,6; 0,8 и 1мл стандартного раствора. В каждую пробирку добавляют соответственно 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,4 и 0,2 мл дистиллированной воды. Затем добавляют последовательно в том же порядке все реактивы, как и в опытную пробу, проводят колориметрирование и строят калибровочную кривую. Откладывают на оси ординат величину оптической плотности, а на оси абсцисс — соответствующее ей количество пировиноградной кислоты (в мкг) в 1 мл (то есть 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 мкг/мл).

Клиническое значение. Пировиноградная кислота — промежуточный продукт углеводного и белкового обмена. Она тесно связана с обменом тиамина. Тиамин в форме тиаминдифосфата является коферментом декарбоксилаз, участвующих в окислительном декарбоксилировании пировиноградной кислоты. При недостатке тиамина в крови и моче повышается концентрация пировиноградной кислоты со всеми последующими патологическими явлениями. Нормальное содержание пировиноградной кислоты в крови колеблется от 0,6 до 1,7 мг% (приложение 6). Повышается ее количество в крови при гиповитаминозе B_1, нарушении окислительно-восстановительных процессов в условиях дефицита кислорода, болезнях печени, кетозе и т. д.

Источники: 69.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ В КРОВИ (ПО БАРКЕРУ И САММЕРСОНУ)

Принцип. Молочную кислоту определяют в безбелковом фильтрате крови или сыворотки. Предварительно осаждают углеводы, добавляя раствор сульфата меди и гидрат окиси кальция. При нагревании с концентрированной серной кислотой из молочной кислоты образуется уксусный альдегид:



Уксусный альдегид, взаимодействуя с пара-оксидифенилом, конденсируется с образованием 1,1 ди-(оксидифенил)-этана, который медленно окисляется, образуя продукт, окрашенный в фиолетовый цвет.

Реактивы. 1. 7,5%-ный раствор трихлоруксусной кислоты.

2. 20%-ный раствор сульфата меди ($CuSO_4 \cdot 5H_2O_2$).

3. 4%-ный раствор сульфата меди.

4. Окись кальция в порошке (CaO).

5. Концентрированная серная кислота, х. ч. (плотность 1,84).

6. 1,5%-ный раствор пара-оксидифенила в 0,5%-ном растворе едкого натра (бесцветный). Хранят в темной склянке в холодильнике 2—3 нед.

7. Стандартные растворы молочнокислого лития: 106,65 мг молочнокислого лития растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Раствор содержит 100 мг% молочной кислоты. Из него перед анализом готовят растворы, содержащие 5, 10, 20, 40, 60, 80 мг%.

Оборудование. Фотоэлектроколориметр; водяная баня на 100° и на 30°; пипетки емкостью 0,1; 0,2; 1,5 мл; пробирки центрифужные.

Ход определения. 1. Осаждение белка. Кровь стабилизируют фтористым натрием из расчета 100 мг на 10 мл крови. В центрифужную пробирку вносят 3 мл свежевзятой крови и медленно (по каплям) прибавляют 3 мл раствора трихлоруксусной кислоты, тщательно перемешивая стеклянной палочкой. Пробирку помещают на 10 мин в баню со льдом для лучшего осаждения белков. После этого центрифугируют 3 мин при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость осторожно сливают в пробирку и используют для определения молочной и пировиноградной кислот.

2. Осаждение углеводов. В пробирку вносят 0,5 мл безбелкового центрифугата, добавляют 4 мл дистиллированной воды, 0,5 мл раствора сульфата меди и 1 г тонкорастертого порошка окиси кальция (на кончике скальпеля). Смесь тщательно перемешивают стеклянной палочкой, после чего она приобретает бирюзовую окраску (наличие зеленоватого оттенка свидетельствует о плохом качестве порошка окиси кальция или других реактивов). Плохие реактивы к использованию не допускают. Реакция осаждения углеводов заканчивается через 30 мин.

3. Окисление молочной кислоты в уксусный альдегид. В пробирку (в бане со льдом) вносят 3 мл концентрированной серной кислоты, добавляют одну каплю 4%-ного раствора сульфата меди для понижения окислительного потенциала. Смесь хорошо взбалтывают, снова помещают в лед и осторожно наслаивают 0,5 мл безбелкового, безуглеводного фильтрата. Смесь тщательно взбалтывают, вынимают из бани со льдом, доводят до комнатной температуры и помещают в кипящую водяную баню на 5 мин. В результате молочная кислота превращается в ацетальдегид.

4. Колориметрирование. После охлаждения реакционной смеси до комнатной температуры (недостаточное охлаждение смеси ведет к разрушению пара-оксидифенила) к ней добавляют одну каплю (0,05 мл) щелочного раствора пара-оксидифенила. Капля должна попасть в раствор. Смесь тщательно встряхивают и на 30 мин ставят в водяную баню или термостат при 30°. Время от времени пробы необходимо взбалтывать, чтобы растворить хлопьевидный осадок, образовавшийся после прибавления пара-оксидифенила (по некоторым данным, пробы можно выдерживать 30 мин при комнатной температуре). За это время реакционная смесь приобретает голубую окраску. После этого пробу помещают на 90 с в бурнокипящую водяную баню (нагревание более 2 мин изменяет спектральную характеристику цвета и делает невозможным его измерение). За это время голубая окраска раствора переходит в стойкую фиолетовую. Пробы охлаждают и измеряют интенсивность окраски на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 5 мм при длине волны 574 нм (красный светофильтр) против контроля.

Контроль: в пробирку вносят 3 мл концентрированной серной кислоты, 1 каплю 4%-ного раствора сульфата меди, ставят в баню со льдом и осторожно наслаивают 0,5 мл 7,5%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Далее контрольную пробу обрабатывают так же, как и опытную.

Расчет. Количество молочной кислоты в крови рассчитывают по калибровочной кривой, построенной по стандартному раствору молочнокислого лития или другой соли этой кислоты. Берут по 0,5 мл стандартных растворов соответствующей концентрации и обрабатывают, как безбелковый, безуглеводный фильтрат. Пробы делают в трех параллелях. Затем выводят среднее значение оптической плотности стандартных растворов. Эту величину откладывают на оси ординат, а на оси абсцисс — количество молочной кислоты в мг% (то есть 5, 10, 20, 40, 60 мг%).

Концентрацию молочной кислоты находят по формуле:

$$X = \frac{a \cdot 100}{б} = \text{мг \% молочной кислоты,}$$

где a — количество молочной кислоты (в мг), найденное по стандартной кривой; b — количество миллилитров крови, взятой для анализа.

Клиническое значение. Молочная кислота образуется при распаде гликогена и глюкозы, ее источником тоже служит пируват. В норме содержание молочной кислоты у животных колеблется в пределах 5—13 мг% (приложение 6). Повышение молочной кислоты отмечают при ацидозе рубца, поедании животными большого количества свеклы, зеленой массы кукурузы в молочно-восковой спелости, зерновых злаковых, содержащих много крахмала. Гиперлактатемия встречается при миоглобинурии, диабете, эндогенной остеодистрофии бычков при интенсивном их выращивании и откорме, когда болезнь сопровождается ацидозом рубца и всасыванием в кровь большого количества молочной кислоты. Повышение концентрации лактата в крови может обусловиться поражением печени, кислородной недостаточностью, чрезмерной физической нагрузкой.

Источник: 16.

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПРОБЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА

Для оценки состояния инсулярного аппарата поджелудочной железы рекомендуют одно- или двукратные сахарные нагрузки. Животным с однокамерным желудком глюкозу или сахар дают внутрь, жвачным глюкозу вводят внутривенно. На 1 кг массы тела берут обычно 1 г глюкозы или 1,5 г сахара. Содержание глюкозы в крови определяют сначала до введения сахаров, а затем через 30 мин, 1 ч, 2 ч, 3 ч. У здоровых животных в ответ на введение глюкозы вырабатывается эквивалентное количество инсулина, вследствие чего уровень сахара в крови существенно не повышается и через 3 ч после введения достигает исходной величины. При недостаточности инсулярного аппарата отмечают повышение уровня сахара в крови, обнаруживают его и в моче.

При поражении печени после сахарной нагрузки также происходит нарастание глюкозы в крови в результате ослабления ассимиляционной способности этого органа. Однако сахарная кривая при этом менее выражена и не достигает таких величин, как при диабете. Помимо однократной сахарной нагрузки, применяют двойную нагрузку по Штаубу — Трауготту, нагрузку адреналином, инсулином, комбинированные нагрузки инсулином, глюкагоном, АКТГ и др., которые позволяют обнаруживать латентные формы сахарного диабета, нарушение функции эндокринных и других органов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СИАЛОВЫХ КИСЛОТ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПО РЕАКЦИИ С РЕЗОРЦИНОМ

Принцип. При добавлении трихлоруксусной кислоты к сыворотке крови и нагревании происходит мягкий гидролиз гликопротеидов с отщеплением нейраминовой кислоты, которая затем вступает в реакцию с раствором резорцина в соляной кислоте с образованием хромогена синего цвета.

Реактивы. 1. Резорциновый реактив. Готовят его в мерной колбе на 100 мл. 200 мг резорцина растворяют в 10 мл дистиллированной воды, добавляют 80 мл концентрированной соляной кислоты (плотность 1,19) и 0,25 мл 0,1 моль/л раствора сернокислой меди. Объем доводят дистиллированной водой до 100 мл. Реактив можно использовать через 4 ч после приготовления. Годен 1 мес при хранении в холодильнике.

2. Реактив для экстракции: 85 мл бутилацетата смешивают с 15 мл бутилового спирта.

3. 5%-ный раствор трихлоруксусной кислоты.

4. Основной стандартный раствор: 50 мг%-ный водный раствор N-ацетилнейраминовой кислоты. Готовят из кристаллической N-ацетилнейраминовой кислоты. 1 мл основного стандартного раствора содержит 0,5 мг этой кислоты.

Оборудование. Фотоэлектроколориметр; водяная баня.

Ход определения. К 0,1 мл сыворотки крови добавляют 1,9 мл 5%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, перемешивают и ставят в кипящую водяную баню на 7 мин (точно!). Пробы охлаждают в проточной воде до комнатной температуры, фильтруют через бумажный фильтр. К 0,5 мл прозрачного фильтрата (что соответствует 0,025 мл сыворотки) добавляют 0,5 мл дистиллированной воды. В каждую пробирку вносят по 1 мл резорцинового реактива и помещают на 15 мин в кипящую водяную баню (пробирку закрывают пробками для уменьшения испарения), охлаждают проточной водой, добавляют по 3 мл раствора для экстракции, встряхивают, оставляют на 15 мин для расслоения фаз. Верхний окрашенный слой отсасывают и измеряют на ФЭКе при длине волны 575—590 нм (желтый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 0,5 см против контроля.

Контроль: к 1 мл дистиллированной воды прибавляют 1 мл резорцинового реактива, помещают на 15 мин в кипящую водяную баню, охлаждают в проточной воде до комнатной температуры, добавляют 3 мл раствора для экстракции, встряхивают, отсасывают верхний слой, который используют в качестве контроля.

Расчет ведут по калибровочному графику: из основного стандартного раствора N-ацетилнейраминовой кислоты готовят разведения (рабочий раствор), как указано в таблице 7.

7. Построение калибровочного графика

№ пробирки	Основной стандартный раствор N-ацетилнейраминовой кислоты, мл	Дистиллированная вода, мл	Концентрация N-ацетилнейраминовой кислоты	
			в рабочем растворе, мг%	в опытной пробе, мг%
1	0,1	0,9	5	20
2	0,2	0,8	10	40
3	0,3	0,7	15	60
4	0,4	0,6	20	80
5	0,5	0,5	25	100

Из каждого рабочего стандартного раствора с указанной в таблице концентрацией берут по 0,1 мл, добавляют 0,9 мл дистиллированной воды и по 1 мл резорцинового реактива и далее обрабатывают, как опытные пробы. Так как в стандарт берут испытуемого раствора в 4 раза больше, чем в опыт (0,1 мг — в стандарт, 0,025 мл — в опыт), для расчета концентрации опытной пробы концентрацию рабочего стандартного раствора соответственно умножают на 4.

Клиническое значение. Сиаловые кислоты являются N-ацетильными производными нейраминовой кислоты, играющей важную роль в качестве строительных блоков структурных полисахаридов. Нейраминовая кислота — производное девятиуглеродной сахарной кислоты. Ее можно рассматривать как продукт присоединения шестиуглеродного аминосахара к трехуглеродной сахарной кислоте. Нейраминовая кислота и ее производные — сиаловые кислоты в свободном состоянии присутствуют в крови, ликворе, слюне и других биологических субстратах.

Содержание нейраминовых кислот в сыворотке крови резко возрастает при многих инфекционных заболеваниях, раковых опухолях, лейкозах, дистрофических и воспалительных процессах в почках (нефрозы, нефриты) и печени (гепатозы), а также при поражении соединительной ткани (коллагенозы) и сердечной мышцы.

Источник: 70.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЕТОНОВЫХ ТЕЛ В КРОВИ ЙОДОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Принцип. Из безбелкового фильтрата перегоняют свободный ацетон и ацетон, образовавшийся из ацетоуксусной и бета-оксимасляной кислот, с прибавлением хромовой смеси и последующим кипячением. В дистилляте определяют весь перегнанный ацетон, связывая его йодом. Ацетон с йодом в щелочной среде образует йодоформ и йодистый натрий. Избыток йода удаляют добавлением серной кислоты, что определяют при помощи титрования раствором гипосульфита. По разности между контролем и опытом находят связанный йод.

Реактивы. 1. 0,3 н. (0,3 моль/л) раствор едкого натра.

2. 5%-ный раствор сернокислого цинка ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$).

3. Бихроматная смесь: 20 г двухромовокислого калия, 200 мл концентрированной серной кислоты, дистиллированная вода до 1 л. В мерную колбу на 1 л вливают 400—600 мл дистиллированной воды, осторожно приливают 200 мл серной кислоты, постоянно помешивая, 20 г мелкоистолченного двухромовокислого калия. После растворения вещества и остывания реактива доливают дистиллированной водой до метки.

4. 20%-ный раствор серной кислоты (по объему).

5. 10%-ный раствор едкого натра.

6. 0,01 н. (0,005 моль/л) раствор йода (готовят перед анализом из 0,1 н. раствора, приготовленного из фиксанала). Титр 0,01 н. раствора йода каждый раз проверяют по 0,01 н. раствору натрия тиосульфата (гипосульфит).

7. 0,01 н. (0,01 моль/л) раствор натрия серноватистокислого, 5-водного $Na_2SO_3 \cdot 5H_2O$ [готовят из 0,1 н. (0,1 моль/л) раствора, приготовленного из фиксанала].

8. 1%-ный раствор крахмала. Готовят заранее насыщенный раствор натрия хлорида, наливают в мерную колбу емкостью 100 мл более чем до половины, 1 г растворимого крахмала растворяют в пробирке в нескольких миллилитрах дистиллированной воды при нагревании, выливают в ту же колбу и доливают раствором хлористого натрия до метки. Раствор стоек; с йодом должен давать чисто синее окрашивание.

Оборудование. Прибор (перегонный аппарат) для определения кетоновых тел (20—30 шт.), его монтируют в вытяжном шкафу (рис. 4); электроплитки

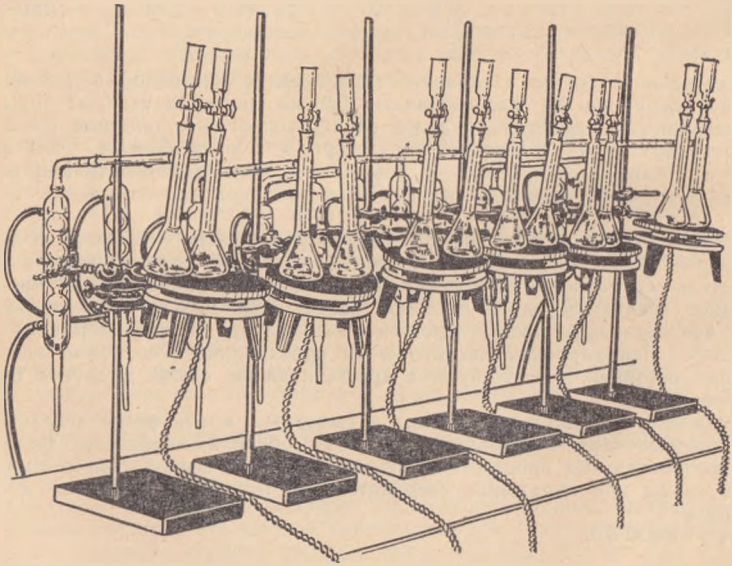


Рис. 4. Перегонный аппарат для определения кетоновых тел.

(8—10 шт.); микробюретки на 2 и 5 мл; стаканчики химические на 75—100 мл.

Ход определения. А. Приготовление безбелкового фильтрата по Сомоджи.

К 5 мл крови добавляют 25 мл дистиллированной воды, 10 мл 0,3 н. раствора едкого натра, перемешивают, затем добавляют 10 мл 5%-ного раствора сернокислого цинка, все тщательно взбалтывают и через 10 мин фильтруют через бумажный фильтр. Разведение крови, таким образом, будет 1 : 10.

Б. Определение общего количества кетоновых тел.

Непосредственно перед работой включают холодильник и аппарат просасывают 20 мин текучим паром, налив в перегонную колбу дистиллированную воду и добавив в нее немного пемзы для равномерного кипения.

В приемный стаканчик вносят 20 мл дистиллированной воды, 2 мл 0,01 н. раствора йода, 2 мл 10%-ного раствора едкого натра и ставят под холодильник перегонного аппарата, чтобы конец его погрузился в жидкость. В перегонную колбу вносят 10 мл фильтрата крови, 15 мл бихроматной смеси и 10 мл дистиллированной воды. Параллельно готовят контроль в двух аппаратах: в перегонную колбу вносят 20 мл дистиллированной воды и 15 мл бихроматной смеси. Приборы закрывают, соединяют холодильники с водой и включают электроплитки. Опытные образцы кипятят 25 мин, контрольные — 15 мин. Отключают нагрев, снимают перегонную колбу, холодильник смывают небольшим количеством дистиллированной воды. Приемный стаканчик закрывают крышкой и ставят в темное место на 15—20 мин. По истечении указанного срока в приемный стаканчик быстро приливают 2 мл 20%-ного раствора серной кислоты, добавляют 2—3 капли 1%-ного раствора крахмала и титруют 0,01 н. раствором гипосульфита до обесцвечивания.

Расчет ведут по формуле: X мг% $= (A—B)\ 0{,}25 \cdot 100$, где X — количество кетоновых тел в мг%; A — количество мл 0,01 н. раствора гипосульфата, пошедшего на титрование свободного йода в контрольной пробе; B — количество мл 0,01 н. раствора гипосульфита, пошедшего на титрование свободного йода в опытной пробе; 1 мл 0,01 н. раствора йода связывает в данных условиях 0,25 мг ацетона; 100 — коэффициент перевода, мг%.

В. Определение ацетона и ацетоуксусной кислоты.

В приемный стаканчик вносят 20 мл дистиллированной воды, 2 мл 0,01 н. раствора йода, 2 мл 10%-ного раствора едкого натра, ставят его под холодильник перегонного аппарата. В перегонную колбу вносят 10 мл фильтрата крови, 1 мл 20%-ного раствора серной кислоты и 15 мл дистиллированной воды. Параллельно готовят два контроля: в перегонную колбу вносят 25 мл дистиллированной воды и 1 мл 20%-ного раствора серной кислоты. Закрывают систему, включают электроплитки и кипятят контроль 15 мин, опытные образцы 25 мин.

Последующий ход анализа такой же, как при определении общего количества кетоновых тел. Расчет ведут по формуле: X мг% $= (A—B) \cdot 10{,}24$, где A — количество мл 0,01 н. раствора гипосульфита, пошедшего на связывание свободного йода в контроле; B — количество мл 0,01 н. раствора гипосульфита, пошедшего па связывание свободного йода в опыте; 10,24 — коэффициент для перевода в мг% в условиях данной реакции. 1 мл 0,01 н. раствора йода соответствует 0,1024 мг ацетона. Количество фильтрата в опыте соответствует 1 мл крови, поэтому связанное количество йода, умноженное на 10,24 ($0{,}1024 \times 100$), будет соответствовать содержанию ацетона и ацетоуксусной кислоты в 100 мл крови.

Г. Определение бета-оксимасляной кислоты.

В приемный стаканчик вносят все те же реактивы, что и для определения общего количества кетоновых тел, ставят его под холодильник. Перегонную колбу после отгонки ацетона и ацетоуксусной кислоты охлаждают и вносят в нее 15 мл бихроматной смеси (не сразу, а в четыре приема). Закрывают систему, подключают электроплитки. Кипятят 28 мин. Необходимо следить, чтобы кипячение в колбе не прекращалось и жидкость не выкипала (не было потемнения бихромата). Если бихромат из воронки весь вылит, а жидкость выкипает, то можно частями долить дистиллированной воды. По истечении 28 мин отсоединяют от холодильника приемную колбу, отключают нагрев. Перегонную колбу и холодильник промывают 4—5 мл дистиллированной воды. Приемный стаканчик ставят в темное место на 15 мин.

Контроль: в перегонную колбу вносят 10 мл дистиллированной воды, 15 мл бихромата. Кипячение продолжается 25 мин. Титруют 0,01 н. раствором гипосульфата, как описано выше.

Расчет ведут по формуле: X мг% $= (A-B) \cdot 25$, где количество 0,01 н. раствора гипосульфита, пошедшего на связывание свободного йода в контроле; B — количество 0,01 н. раствора гипосульфита, пошедшего на связывание свободного йода в опыте; 25 — коэффициенты для перевода в мг%.

Примечание. В лаборатории, где проводят определение кетоновых тел, должен быть чистый и свежий воздух. В этих условиях количество 0,01 н. раствора гипосульфита, пошедшего на титрование контрольных проб, должно быть только на 0,1—0,15 мл меньше, чем было затрачено его при установлении титра 0,01 н. раствора йода, то есть на 2 мл должно пойти не менее 1,85—1,90 мл.

Проверяют чистоту воздуха следующим образом. Рядом с перегонным аппаратом ставят приемный стаканчик, в который внесено 5 мл дистиллированной воды, 2 мл 10%-ного раствора едкого натра и 2 мл 0,01 н. раствора йода. Смеси дают постоять 20—30 мин, после чего приливают 2 мл 20%-ного раствора серной кислоты, 2—3 капли раствора крахмала и титруют 0,01 н. раствором гипосульфита. Если в лаборатории воздух чистый, то на титрование пойдет около 1,9—1,85 мл раствора гипосульфита, при его загрязнении — значительно меньше.

Клиническое значение. Кетоновые (ацетоновые) тела (бета-оксимасляная кислота, ацетоуксусная кислота и ацетон) — промежуточные продукты обмена жиров, углеводов и белков. Повышение уровня кетоновых тел в крови, моче, молоке и других биологических субстратах свидетельствует о нарушении обмена веществ. Пределы колебаний содержания кетоновых тел в крови здоровых животных приведены в приложении 6.

Стойкое повышение кетоновых тел в крови (кетонемия) встречается у животных при острой и подострой формах кетоза. При этом соотношение бета-оксимасляной кислоты, ацетоуксусной кислоты и ацетона меняется в сторону увеличения ацетона и ацетоуксусной кислоты. Нами установлено, что наибольшая концентрация кетоновых тел бывает в начальный период кетоза, когда у животных сохраняется аппетит и они поедают большое количество корма. При затяжном течении болезни, потере аппетита и исхудании содержание кетоновых тел в крови падает и нередко не выходит за верхние пределы нормы.

Умеренная вторичная кетонемия может быть при задержании последа, эндометрите, травматическом ретикулоперитоните, хирургической инфекции и других септических процессах. Вторичная кетонемия (кетонурия) носит нестойкий характер и исчезает с устранением основного первичного заболевания. Если кетонемия при кетозе встречается в стаде у многих животных, то вторичную кетонемию отмечают у единичного числа животных.

Источники: 73,109.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА

ВЫДЕЛЕНИЕ ЛИПИДОВ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ

В основе выделения липидов лежат такие операции, как экстракция, очистка их от нелипидных компонентов, концентрация и определение суммарного выхода липидов методом взвешивания на аналитических весах. Среди известных в настоящее время методов выделения липидов из биологических материалов в лабораторной практике наиболее распространен метод Фолча.

Метод экстракции липидов хлороформ-метаноловой смесью (по Фолчу). *Принцип* метода заключается в разрушении липидно-белковых связей полярными растворителями (в данном случае метанолом), что облегчает последующее экстрагирование липидов неполярными растворителями (хлороформом, диэтиловым или петролейным эфиром). В данном случае полярные и неполярные растворители представлены в виде одной смеси. Метод пригоден для извлечения липидов из любых тканей животного и растительного происхождения и

в настоящее время считается универсальным. Обязательное требование данного метода — соблюдение соотношения субстрата и растворителя 1 : 20.

Реактивы. 1. Хлороформ. Из хлороформа необходимо удалить фосген, который реагирует с окси- и аминогруппами липидов. Свежий продажный хлороформ достаточно перегнать и хранить в темной бутылке с добавлением 1% метанола (или этанола), который препятствует образованию фосгена.

2. Метанол. Его освобождают от альдегидов перегонкой над гранулированной гидроокисью калия. Перегнанный метанол хранят в темной бутылке 1—2 мес.

3. Смесь хлороформ-метанола в соотношении 2 : 1 по объему (смесь 1).

4. Смесь растворителей верхней фазы, содержащая минеральные соли (смесь 2): хлороформ-метанол — водный раствор соли в соотношении 3 : 48 : 47 по объему. В качестве солей можно использовать KCl (0,74%), NaCl (0,58%) или $CaCl_2$ (0,04%).

5. Антиоксидант — бутилокситолуол (БОТ, ионол).

Оборудование. Пробирки обычные и с притертыми пробками емкостью 10, 20 и 50 мл; цилиндры мерные с притертыми пробками емкостью 25, 50 и 100 мл; конические колбочки с плоским дном обычные и с притертыми пробками на 50 и 100 мл; пипетки с делениями разных объемов; гомогенизатор; водоструйный насос; роторный испаритель; аналитические весы.

Ход выделения. В пробирку или колбу наливают необходимое количество смеси 1, куда из пипетки вносят необходимый объем сыворотки (плазмы) крови или молока (например, 40 мл хлороформ-метаноловой смеси и 2 мл сыворотки, соотношение 1 : 20). Чтобы избежать окисления липидов, к пробам добавляют антиоксидант — бутилокситолуол (БОТ), который вносят с метанолом в количестве 0,1% от количества липидов. Смесь тщательно перемешивают стеклянной палочкой или покачиванием колбы и оставляют стоять или подогревают на водяной бане при 40—45°С 3—5 мин, затем фильтруют через обезжиренный бумажный или стеклянный фильтр в мерный цилиндр с притертой пробкой (объемом 50 мл).

Желток яйца вносят в колбочку с известной массой, взвешивают и затем заливают смесью 1.

Печень или мышечную ткань отвешивают, помещают в стакан гомогенизатора, добавляют такое же количество физраствора и гомогенизируют 2—3 мин. Затем отвешивают необходимое количество (2—6 г) гомогената в плоскодонную колбочку, заливают 20 частями смеси 1, тщательно перемешивают стеклянной палочкой, оставляют на 1 ч или подогревают на водяной бане 5—10 мин, а потом фильтруют в мерный цилиндр.

Для экстракции липидов из кормов или сухих образцов животных тканей их измельчают, заливают смесью 1, колбочки закрывают пробкой и оставляют для экстракции на 18—24 ч (с периодическим перемешиванием) или встряхивают на шуттель-аппарате в течение 1,5—2 ч. Содержимое подогревают при 45—50°С 5—10 мин и фильтруют.

Для удаления нелипидных соединений из экстракта к последнему добавляют $^1/_5$ объема воды (это соотношение следует строго соблюдать, в противном случае расслоения смеси на две фазы не произойдет), цилиндр закрывают притертой пробкой, энергично встряхивают до образования молокообразной взвеси и оставляют стоять на ночь для расслоения или содержимое переносят в пробирки и центрифугируют.

Верхний водно-спиртовой слой (≈40%), содержащий нелипидные вещества, удаляют пипеткой, присоединенной к водоструйному насосу. При этом нельзя затрагивать пограничную (липопротеидную) пленку. Если в ней много нелипидных соединений (рыхлая, белого цвета), то ее следует отмыть. Для этого по стенке цилиндра пипеткой наслаивают 1—2 мл смеси 2. Цилиндр осторожно поворачивают вокруг его оси и смесь отсасывают. При необходимости эту операцию повторяют 2—3 раза. Утонченную пленку растворяют каплями метанола.

В нижнем хлороформенном слое (≈60%) концентрируются липиды. Для определения количества экстрагированных из исследуемой пробы липидов можно использовать два метода.

1. Исходный экстракт переносят в предварительно обезжиренную и взве-

шенную колбу со шлифом, присоединяют к роторному испарителю и отгоняют хлороформ под вакуумом (присоединяя к водоструйному насосу) с подогревом до 40°С. Эта операция занимает 5—7 мин. Если на стенке отгонной колбы остаются капли воды, их удаляют добавлением 0,2—0,3 мл ацетона с последующей его отгонкой. После этого колбы с липидами тщательно протирают полотенцем и в открытом состоянии помещают в эксикатор, заполненный влагопоглощающим веществом, через 2—3 ч взвешивают на аналитических весах. Определяют количество липидов, добавляют в колбу определенное количество хлороформа или лучше смеси (для получения раствора нужной концентрации), тщательно растворяют липиды и переносят их в пробирку с притертой пробкой, продувают азотом, закрывают и хранят в холодильнике.

2. Экстракт липидов доводят до определенного объема и 1—2 мл раствора переносят в предварительно взвешенный бюкс или небольшой стакан и помещают на песчаную баню под вытяжным шкафом или в термостат при 60°С. Высушивают до постоянной массы. На основании количества липидов, обнаруженного в высушенном объеме экстракта, определяют концентрацию липидов в исследуемом субстрате.

Исходный или сконцентрированный экстракт после определения в нем концентрации липидов используют для определения содержания фосфолипидов, триглицеридов, холестерина или изучения жирнокислотного состава общих липидов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЛАССОВ ЛИПИДОВ

Определение содержания фосфолипидов (по Бартлетту — Ушеру). *Принцип.* Метод основан на минерализации липидов с помощью хлорной кислоты. Неорганический фосфор, взаимодействуя с молибдатом аммония, образует фосфорномолибденовую кислоту, которую восстанавливают эйконогеном и пиросульфитом натрия в молибденовую синь. По степени окраски, определяемой колориметрически, вычисляют количество фосфора, содержащегося в фосфолипидах.

Реактивы. 1. Экстракционная смесь Фолча (хлороформ-метанол, 2 : 1).

2. 72%-ная хлорная кислота ($HClO_4$) или смесь равных объемов 60%-ной хлорной и 95—97%-ной серной кислоты (плотность 1,84).

3. 5%-ный раствор молибдата аммония ($(NH_4)_6 \cdot Mo_7O_{24} \cdot H_2O$).

4. Сульфит-сульфоновый реактив: 13 г пиросульфита натрия ($Na_2S_2O_5$), 0,5 г сульфита натрия (Na_2SO_3) и 0,25 г эйконогена (1-амино-2-нафтол-4-сульфоновая кислота) растворяют в 100 мл дистиллированной воды (перегнанной в стеклянном дистилляторе) при постоянном встряхивании в течение 1 ч. Фильтруют через бумажный фильтр (лучше через синтетический № 4) и хранят в темной склянке. Реактив готовят еженедельно.

Оборудование. ФЭК или спектрофотометр; песчаная баня; водяная баня; колбочки плоскодонные на 50—100 мл; воронки; пробирки с притертыми пробками и делениями на 10 мл; пипетки.

Ход определения. Для анализа берут 0,5 мл сыворотки крови, 0,5 г гомогепата тканей или 0,2—0,4 г желтка и экстрагируют по методу Фолча. В две параллельные пробирки вносят экстракт липидов в объеме, соответствующем 0,1 мл сыворотки крови, 0,02 г тканей или 0,01 г яичного желтка, добавляют по 0,6 мл хлорной кислоты и ставят на прокаленный песок (180°С).

После просветления содержимого (через 1—1,5 ч) пробирки охлаждают, тщательно перемешивают и в них последовательно добавляют следующие реактивы: по 4 мл дистиллированной воды, по 0,2 мл сульфит-сульфонового реактива и по 0,2 мл раствора молибдата аммония. Затем пробирки закрывают и помещают в водяную баню при 100°С на 10 мин. После охлаждения колориметрируют при длине волны 660 или 830 нм в кюветах с толщиной слоя 0,5—1 см против контрольной пробы (без липидов).

Расчет ведут по калибровочному графику, для построения которого используют двузамещенный фосфорнокислый калий (KH_2PO_4), высушенный до постоянной массы. 2,194 г реактива растворяют в 500 мл бидистиллированной воды. 1 мл такого раствора содержит 1 мг фосфора. Из основного раствора готовят рабочий раствор путем 50-кратного разведения водой (в 1 мл содер-

жится 20 мкг фосфора). Если определение оптической плотности проводят на ФЭКе, то калибровочный график строят в пределах от 0,2 до 20 мкг, если же на спектрофотометре, то от 5 до 60 мкг фосфора, как указано ниже.

№ пробирки	Рабочий раствор KH_2PO_4, мл	Бидистиллированная вода, мл	Концентрация фосфора, мкг/мл
1	0,1	9,9	0,2
2	0,3	9,7	0,6
3	0,5	9,5	1
4	2,5	7,5	5
5	5,0	5,0	10
6	7,5	2,5	15
7	10,0	—	20

Из каждого разведения берут по 2 мл калибровочного раствора, вносят в 2—3 параллельные пробирки и далее проделывают все операции, как описано выше. На основании полученных данных строят калибровочный график.

Для пересчета фосфора в фосфолипиды найденное количество липидного фосфора умножают на 25. Считают, что в фосфолипидах содержится в среднем 4% фосфора.

Клиническое значение. Фосфолипиды поступают в кровь главным образом из печени, поэтому их уровень тесно связан с функциональным состоянием данного органа. Нормативы концентрации общих фосфолипидов представлены в приложении 6.

Повышается концентрация фосфолипидов в сыворотке крови при стеотозе (жировой дегенерации) печени, тяжелой форме сахарного диабета, нефрозе и нефрите, постгеморрагической анемии. Снижение уровня фосфолипидов — частый признак острого и хронического гепатита различной этиологии; оно отмечается также при неполноценном кормлении, особенно белково-витаминной недостаточности, при дисбалансе аминокислот в рационе, алиментарной дистрофии, анемиях.

Источник: 134

Определение триглицеридов (по Сардесаю и Маннингу). *Принцип.* Метод представляет собой модификацию метода Ван-Ханделя и Зильверсмита (1957) для прямого определения триглицеридов. Глицерол, освобожденный омылением, окисляется до формальдегида, концентрацию которого устанавливают колориметрически с применением реакции Hantzsch. Данным методом выявляют триглицериды во всех биологических субстратах — сыворотке крови, печени, мышцах, жировой ткани и др.

Реактивы. 1. Экстрагирующая смесь (хлороформ-метанол, 2 : 1 или спирт-эфир, 3 : 1).

2. Кремниевая кислота (силикагель), активированная при 105°С в течение 10—12 ч.

3. Спиртовой раствор КОН: 2 г растворяют в минимальном количестве дистиллированной воды и объем доводят 95%-ным этиловым спиртом до 100 мл (основной раствор). Для приготовления рабочего раствора 10 мл основного раствора доводят 95%-ным этиловым спиртом до 50 мл (готовят в день применения).

4. Серная кислота — 0,1 моль/л раствор.

5. Метперйодат ($NaJO_4$) — 0,05 моль/л раствор.

6. Арсенит натрия ($NaASO_2$) — 0,5 моль/л раствор.

7. Ацетил-ацетоновый реактив, pH 6 при 25°С. 150 г уксуснокислого аммония, 3 мл ледяной уксусной кислоты и 2 мл ацетил-ацетона растворяют в 1 л дистиллированной воды. Реактив стоек в течение 2 нед при хранении в холодильнике.

8. Стандартный раствор триглицеридов (1%-ный): 1 г триолеина или оливкового масла растворяют в 100 мл хлороформа. Стоек в течение 2 мес при хранении в холодильнике.

Оборудование. Спектрофотометр или калориметр; водяная баня; пробирки обычные и центрифужные с делениями; колбочки или пробирки с притертыми пробками объемом 10 мл; делительные воронки объемом 25—50 мл.

Ход определения. 0,1 мл сыворотки (плазмы) вносят в колбочку, заливают экстрагирующей смесью и тщательно перемешивают. Через 2—3 мин содержимое пропускают через обезжиренный бумажный фильтр в мерную колбочку, доводят до 10 мл. В делительную воронку на 25 мл вносят 8 мл дистиллированной воды и 8 мл фильтрата (что соответствует 0,08 мл сыворотки). Содержимое хорошо перемешивают, отстаивают и нижний слой пропускают через стеклянную колонку размером 0,8×16 см (для задержки фосфолипидов), приготовленную следующим путем: в центрифужной пробирке спиливают дно, помещают кусочек стеклянной ваты и 0,5 г активированной кремниевой кислоты. Затем колонку промывают хлороформом, который также собирают в колбочку. Объем доводят до метки. Затем в три пробирки вносят по 3 мл фильтрата (что соответствует 0,024 мл сыворотки или плазмы) и после выпаривания растворителя в водяной бане в первые две пробирки добавляют по 0,5 мл спиртового раствора КОН (омыляемые пробы), а в третью — 0,5 мл спирта (неомыляемая проба) и пробирки инкубируют в водяной бане 15 мин при 60°С. В конце инкубации в каждую пробирку добавляют по 0,5 мл 0,2 н. раствора серной кислоты, а затем по 0,1 мл 0,05 моль/л раствора метперйодата натрия (для окисления глицерола, освобожденного омылением).

Через 10 мин (точно!) окисление приостанавливают добавлением по 0,1 мл 0,5 моль/л раствора арсенита натрия. Через 5—7 мин, когда испарится освободившийся йод, пробирки извлекают из банки и в них добавляют по 0,8 мл воды и по 2 мл ацетил-ацетонового реактива. Содержимое тщательно перемешивают перевертыванием пробирки и инкубируют в водяной бане при 58°С в течение 10 мин. Затем пробирки охлаждают до комнатной температуры и колориметрируют при длине волны 412 нм в кювете с толщиной слоя 0,5 см против контроля.

Степень поглощения омыляемой пробы минус степень поглощения неомыляемой пробы соответствует количеству триглицеридов, содержащемуся в 0,24 мл исходного объема сыворотки (плазмы) крови. В используемом объеме сыворотки (плазмы) крови показания неомыляемых проб обычно очень малы и не имеют существенного значения.

Расчет ведут по формуле или по калибровочному графику, который строят в пределах от 10 до 250 мкг/мл триглицеридов.

X мг% $= E_{оп}/E_{ст} \cdot C_{ст}$, где $E_{оп}$ — экстинкция опытной пробы; $E_{ст}$ — экстинкция стандартной пробы; $C_{ст}$ — концентрация триолеина в стандартном растворе, мг%.

Из основного раствора (8) готовят серию рабочих калибровочных растворов.

№ пробирки	Стандартный раствор, мл	Хлороформ, мл	Концентрация триглицеридов, мкг/мл
1	0,1	9,9	10
2	0,5	9,5	50
3	1,0	9,0	100
4	1,0	4,0	200
5	1,0	3,0	250

По 1 мл каждого рабочего раствора вносят в 5 опытных пробирок и 1 мл хлороформа в шестую пробирку для контроля на реактивы. Все пробирки помещают в кипящую баню на 10 мин для удаления хлороформа. После этого в пробирки добавляют по 0,5 мл спиртового раствора КОН и процедуру проводят, как описано выше.

Примечания. 1. Для анализа лучше использовать плазму крови, полученную на холоду, так как в сыворотке при получении происходит частичный гидролиз триглицеридов. 2. В качестве антикоагулянта при-

меняют ЭДТА натриевой или калиевой соли (1 мг на 1 мл крови). Гепарин применять не следует, так как он активирует липопротеидную липазу, гидролизирующую триглицериды.

Клиническое значение. Концентрация триглицеридов (нейтральных жиров) в сыворотке крови животных повышается при кормлении их по рационам, обогащенных кормовыми жирами, или по рационам, богатых легкодоступными углеводами (картофель, зерно кукурузы, пшеницы и др.), активизирующих липогенез в печени (у моногастричных). Недостаток в рационах протеина и липотропных веществ (холина, метионина, треонина, селена, витамина Е и др.) также сопровождается нарастанием содержания нейтральных липидов в сыворотке крови животных. Увеличение концентрации триглицеридов отмечают при острых гепатитах, жировой дистрофии печени, нефрозах, диабете. Снижение их концентрации наблюдают при низком уровне кормления животных, усиленной молокоотдаче. Нормативы содержания триглицеридов в сыворотке крови животных приведены в приложении 6.

Источники: 7, 153.

Определение содержания неэтерифицированных жирных кислот (НЭЖК) в сыворотке крови (по Лауреллу и Тибблингу). *Принцип.* Метод основан на образовании комплексных соединений НЭЖК с медью, которые с дифенилкарбозидом дают розово-малиновую окраску.

Данный метод по сравнению с другими более чувствителен.

Реактивы. 1. Экстрагирующая смесь (ЭС): хлороформ-гептан 4 : 3 (об/об), содержащая 2% метанола.

2. Кремниевая кислота порошкообразная, предварительно активированная при 120°С 12 ч.

3. Меднотриэтаноламиновый реактив (CuТЭА): 10 мл 0,5 моль/л раствора азотнокислой меди — $Cu(NO_3)_2$, 10 мл 1 моль/л триэтаноламина (ТЭА) и 3,5 мл 1 моль/л NaOH растворяют в воде и доводят до 100 мл. В данном растворе растворяют 33 г NaCl, pH доводят до 8,1. Раствор готовят каждые 2 нед.

4. 4%-ный раствор дифенилкарбазида (ДФК) в этаноле. Готовят ежедневно. Непосредственно перед применением 0,1 мл 1 моль/л ТЭА добавляют к 10 мл 0,4%-ного раствора ДФК.

5. Стандартный раствор пальмитиновой кислоты (а. м.=256,42) — 0,005 и 0,001 мкМ/л. Для этого 25,642 мг пальмитиновой кислоты растворяют в 100 мл ЭС, получают 1 мМ/л раствор. Затем 1 мл данного раствора доводят до 10 мл ЭС в мерной колбочке, получают 0,1 мкМ/л. Далее из данного раствора путем разведения ЭС получают растворы с концентрацией 0,005 и 0,01 мкМ/л пальмитиновой кислоты.

Оборудование. ФЭК или спектрофотометр; пробирки с притертыми пробками объемом 15—20 мл; центрифужные пробирки с притертыми пробками объемом 10 мл; встряхиватель. Стеклянную посуду, предназначенную для определения НЭЖК, выдерживают несколько часов в 1 моль/л растворе HCl и тщательно моют деминерализованной водой.

Ход определения. В пробирку с притертой пробкой вносят 250 мг активированной кремниевой кислоты с последующим внесением 9 мл ЭС и по 0,075 мл сыворотки (плазмы). Пробирки немедленно закрывают, закрепляют на встряхивателе со штативом в горизонтальном положении. Встряхивают 10 мин, а после 15-минутного стояния еще 1—2 мин (можно вручную).

Одновременно готовят стандарт. Для этого в три пробирки вносят по 0,5 г кремниевой кислоты, далее в первую добавляют 9 мл ЭС, во вторую — 9 мл 0,005 и в третью — 9 мл 0,01 мкМоль/л раствора пальмитиновой кислоты. Пробирки стандарта встряхивают вместе с пробами.

Затем пробирки центрифугируют 10 мин при 2500—3000 об/мин. 5 мл верхней фазы переносят в пробирки с притертой пробкой, куда добавляют 2 мл CuТЭА раствора. Опять встряхивают и центрифугируют. Затем 3 мл верхней фазы (осторожно, не касаясь стенок и нижнего слоя) переносят в обычную пробирку (опыт и контроль) и добавляют по 0,5 раствора ДФК, перемешивают и оставляют стоять в темном месте; через 15 мин появляется розово-малиновая окраска, интенсивность которой измеряют на ФЭКе или спектрофотометре при длине волны 550 нм против воды.

Расчет проводят по формуле:

$$\frac{\text{Показатель пробы}}{\text{Показатель стандарта}} \cdot 1200 = \text{мкМ/л}.$$

Перед расчетом из показаний экстракции стандартной пробы (0,01 мкМ) следует вычесть показания экстинкции слепой пробы.

Расчет можно проводить и по калибровочному графику, который строят с использованием раствора пальмитиновой кислоты в пределах 0,005—0,025 мкМ/л.

Клиническое значение. Концентрация НЭЖК в сыворотке крови (приложение 6) тесно связана с энергетической обеспеченностью организма животных и характеризует активность процессов мобилизации их из жировых депо. Поэтому при недостаточном поступлении энергии в организм концентрация НЭЖК в сыворотке крови соответственно возрастает. Часто это происходит параллельно увеличению концентрации кетоновых тел в крови.

Повышенная концентрация НЭЖК в сыворотке крови может быть результатом кормления по рационам, обогащенным кормовыми жирами; под влиянием инъекций адреналина; под воздействием стрессовых ситуаций; при диабете, ожирении, кетозе. Снижается концентрация НЭЖК при введении глюкозы и инсулина.

Источники: 149, 154.

Определение общего холестерина в сыворотке крови. *Принцип.* В основу метода положена модифицированная Ильком реакция Либермана — Бурхарда, которая дает изумрудно-зеленое окрашивание в присутствии холестерина и смеси ледяной уксусной кислоты, уксусного ангидрида и концентрированной серной кислоты. Данный метод позволяет определять содержание холестерина без предварительной экстракции липидов из сыворотки крови.

Реактивы. 1. Смесь ледяной уксусной кислоты, уксусного ангидрида и концентрированной серной кислоты (1 : 5 : 1). При смешивании ингредиентов следует избегать нагревания смеси. Поэтому колбу, в которой приготавливают реактив, помещают в сосуд со льдом, а серную кислоту добавляют в последнюю очередь медленно по каплям, постоянно помешивая. Смесь должна быть бесцветной или желтоватая; длительно сохраняется в холодильнике. 2. Стандартный раствор холестерина (100 мг холестерина в 100 мл хлороформа).

Оборудование. ФЭК или спектрофотометр; термостат; пробирки; штатив для пробирок; пипетки мерные емкостью 0,1 и 5 мл.

Ход определения. К 2 мл реактива 1 добавляют 0,1 мл негемолизированной сыворотки, встряхивают короткими энергичными движениями и помещают в термостат на 20 мин при +37°С. Окрашенную в зеленый цвет жидкость колориметрируют на спектрофотометре (длина волны 650—660 ммк) или на ФЭКе (красный светофильтр) в кюветах диаметром 0,5 см против контрольной пробы на реактивы (вместо сыворотки вносят 0,1 мл воды).

Расчет проводят по предварительно составленному калибровочному графику. Рабочий раствор холестерина готовят разведением стандартного в 10 раз (10 мл стандартного раствора +90 мл хлороформа). 1 мл рабочего раствора содержит 0,1 мг холестерина. Затем в пробирки вносят по 0,1; 0,25; 0,50; 1; 1,5; 2; 2,5 и 3 мл рабочего раствора, что соответствует 0,01; 0,025; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25 и 0,30 мг холестерина. В девятую пробирку вносят 1 мл хлороформа. Пробирки помещают в водяную баню для выпаривания досуха хлороформа; добавляют в них по 2 мл реактива 1 и далее поступают, как описано выше.

При постановке реакции используют абсолютно чистые и совершенно сухие пипетки и пробирки. Соотношение ингредиентов реактива рассчитано так, что белки сыворотки не выпадают в осадок. Появление мути может быть вызвано только наличием воды в реактиве или посуде.

При исследовании холестерина в экстракте липидов его вносят в пробирку в объеме, содержащем не более 1—5 мг чистых липидов.

Клиническое значение. Холестерин в сыворотке крови животных находится в двух формах — свободной и эфиросвязанной с различными жирными кислотами. С возрастом концентрация холестерина возрастает (приложение 6). Гиперхолестеринемия отмечается при диабете, нефрозе, пониженной функции щитовидной железы; в начале голодания; у свиней и птицы — при кормлении их по рационам, обогащенным кормовыми жирами. При остром ге-

натите уровень общего холестерина в начале заболевания обыкновенно повышается, а затем падает ниже нормы. Для заболевания печени характерно падение эфиросвязанной фракции холестерина. Острое падение этой фракции холестерина в крови — плохой прогностический признак, указывающий на острую желтую атрофию печени или острое отравление ее.

Источник: 10.

Определение этерифицированного холестерина в сыворотке крови (по Балаховскому). *Принцип.* Метод основан на связывании свободного холестерина дигитонином (благодаря чему образуется нерастворимое в хлороформе соединение) и растворении хлороформом эфиросвязанного холестерина. Хлороформенный экстракт, содержащий эфиросвязанный холестерин, используется для цветной реакции с реактивом Илька (или другим специфическим реактивом).

Реактивы. 1. Экстрагирующая смесь (хлороформ-метанол, 2 : 1, или этанол-эфир, 3 : 1).

2. 1%-ный спиртовой раствор дигитонина: 1 г дигитонина растворяют в 50 мл этилового спирта и доводят до 100 мл дистиллированной водой с подогревом.

3. Смесь ледяной уксусной кислоты, уксусного ангидрида и концентрированной серной кислоты (1 : 5 : 1). Готовят, как описано выше.

Оборудование. Центрифужные пробирки; пробирки с притертыми пробками емкостью 10 мл; пипетки емкостью 0,1; 1 и 5 мл; штатив для пробирок; водяная баня; центрифуга; ФЭК или спектрофотометр.

Ход определения. 0,1 мл сыворотки (плазмы) крови вносят в центрифужную пробирку, содержащую 5 мл экстрагирующей смеси, тщательно перемешивают стеклянной палочкой и оставляют на 5—10 мин при использовании хлороформ-метаноловой смеси или на 1 ч при использовании спирто-эфирной смеси. Затем центрифугируют 10—15 мин при 2000—3000 об/мин. Центрифугат осторожно сливают в пробирку с притертой пробкой и ставят в водяную баню для выпаривания (не досуха, оставляют 0,5—1 мл центрифугата). Прибавляют 1 мл раствора дигитонина и перемешивают. Образуется белый налет — комплекс свободного холестерина с дигитонином. Оставляют стоять на 2—3 ч (или на ночь), а потом выпаривают досуха. После охлаждения в пробирку добавляют 5 мл хлороформа, тщательно взбалтывают. Хлороформный экстракт фильтруют через обезжиренный бумажный фильтр или сливают после центрифугирования и используют для цветной реакции. С этой целью экстракт упаривают до минимума, добавляют 2 мл реактива 3, ставят в темное место на 20 мин, после чего колориметрируют. Хлороформ извлекает эфир холестерина, но не растворяет ни дигитонин-холестериновый комплекс, ни избыточный дигитонин.

Расчет проводят по калибровочной кривой, составленной для общего холестерина. По разности между общим и связанным находят количество свободного холестерина.

Клиническое значение. В норме доля эфиросвязанного холестерина в сыворотке крови животных составляет 70—95%, у птиц — 60—70%. В результате все изменения его содержания отражают главным образом состояние печени, где синтезируется эта фракция. Снижение данной фракции часто является следствием поражения синтетической функции печени.

Источник: 11.

Определение бета-липопротеидов в сыворотке крови (по Бурштейну в модификации Виноградовой). *Принцип.* В основе метода лежит реакция избирательного осаждения бета-липопротеидов сульфатом декстрина или гепарином в присутствии двухвалентных катионов.

Реактивы. 1. 0,025 моль/л раствор $MnCl_2$. 2. 1%-ный раствор гепарина (1 мл должен содержать 1000 МЕ, продажный гепарин, содержащий 25 000 МЕ в 5 мл, разводят дистиллированной водой 1 : 4).

Оборудование. ФЭК или спектрофотометр; пробирки; штатив для пробирок; стеклянные палочки; пипетки.

Ход определения. 2 мл 0,025 моль/л раствора $MnCl_2$ вносят в пробирку и к нему прибавляют 0,2 мл сыворотки крови, перемешивают и определяют оптическую плотность пробы (E_1) на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 0,5 см при длине волны 700—720 нм (красный фильтр) против воды. Затем в кювету добавляют 0,04 мл 1%-ного раствора гепарина. Пробы тщательно перемешивают стеклянной палочкой и точно через 10 мин повторяют фотометрирование (E_2).

Разница E_2—E_1 приходится на оптическую плотность, обусловленную осадком бета-липопротеидов. Умножая ее на коэффициент 1164 (определен расчетным способом), получают количество бета-липопротеидов в сыворотке крови в мг%.

Примечания. 1. Кровь берут натощак. 2. Сыворотка сохраняется 2 сут.

Клиническое значение. Основная часть липидов сыворотки крови представлена в виде гидрофильных комплексов альфа- и бета-липопротеидов. Следовательно, липопротеиды являются главной транспортной формой липидов. Так, например, на долю бета-липопротеидов приходится 60—70% всех липидов сыворотки крови. Липопротеиды синтезируются в печени, поэтому определение их концентрации имеет важное клинико-физиологическое значение.

Повышение бета-липопротеидов в крови отмечают при увеличении в рационах высокожировых кормов, острых гепатитах, диабете, ожирении, гипотериозе, желтухах.

Источники: 9, 136.

РАЗДЕЛЕНИЕ ЛИПИДОВ НА КЛАССЫ МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ (ТСХ)

Принцип. В основе метода лежит адсорбционная хроматография, основанная на сорбции растворенного вещества твердой фазой — активным сорбентом. Подвижная фаза (растворитель с разделяемой смесью веществ) движется по неподвижной фазе (сорбенту), и при этом разделяемые компоненты перемещаются с различной скоростью в направлении движения растворителя. В качестве сорбента для разделения липидов и фосфолипидов чаще применяют силикагель ($SiO_2 \cdot nH_2O$). Адсорбирующие свойства силикагеля объясняются наличием группы SiOH, имеющей свободные водородные связи. Присутствие моно- или мультимолекулярных слоев адсорбированной воды ухудшает разделяющие свойства силикагеля. Поэтому, чтобы повысить способность у сорбента, пластинки с силикагелем нагревают до 100—115° для удаления воды.

Метод ТСХ позволяет разделить сложные смеси липидов на классы: фосфолипиды, моно-, ди- и триглицериды, НЭЖК, холестерин свободный и этерифицированный; фосфолипиды — на подклассы; фосфатидилхолин (лецитин), фосфатидилэтаноламин и т. д. и тем самым упрощает и повышает точность количественного определения отдельных классов и подклассов липидов, а также их выделение для дальнейшего изучения.

Разделение общих липидов на классы с помощью ТСХ включает следующие операции: приготовление тонкого слоя силикагеля на стекле, активизация его, нанесение общих липидов на тонкий слой, разделение липидов в системе растворителей, проявление и идентификация отдельных классов липидов, их количественное определение.

Реактивы. 1. Силикагель для ТСХ с величиной частицы 10—40 мкм, приготовленный путем измельчения отечественного гранулированного препарата марки КСК, или силикагель марки ЛС 5/40 (ЧССР).

2. Петролейный эфир с точкой кипения 40—60°С.

3. Этиловый эфир (лучше для наркоза) с точкой кипения 35—36°С.

4. Уксусная кислота ледяная.

5. Хлороформ перегнанный.

6. Йод кристаллический.

7. 5—10%-ный спиртовой раствор фосфорномолибденовой кислоты или 10—15%-ный водный раствор серной кислоты.

8. Свидетели — соединения отдельных классов липидов: триглицеридов, свободных жирных кислот, холестерина свободного и этерифицированного. В качестве таковых используют трипальмитат или триолеат, пальмитиновую или другую жирную кислоту, холестерин и холестерин-эфир любой кислоты (3—5%-ной концентрации в хлороформе).

Оборудование. 1. Пластинки стеклянные 20×20 см или любого другого размера.

2. Станок для фиксации пластинок — гладкоотструганная доска длиной 100—120 см и шириной 20,7 см, с гладкими бортиками по краям высотой 1,5—

2 см. В начале и конце станка также устанавливают бортики-ограничители. Перед работой плоскость станка покрывают на всю длину полиэтиленовой пленкой.

3. Металлический аппликатор, позволяющий наносить слой силикагеля нужной толщины. Изготавливают его из цельнометаллического прямоугольного бруска нержавеющей стали (имеет вид ящика без дна 19×5 см по внешним параметрам). Сверху с обеих торцовых сторон бруска оставляют специальные выступы для удобства его захвата при работе. Аппликатор плотно прилегает к поверхности стекла, но у его задней стенки есть зазор (щель) высотой 3—5 мм, толщина которой регулируется закрепляющейся на винтах подвижной пластинкой (шторкой).

4. Кассета для сушки и хранения готовых пластинок.

5. Стеклянная камера (прямоугольная или круглая) с притертой крышкой для хроматографии.

6. Сушильный шкаф.

7. Эксикатор.

8. Микропипетки емкостью 0,1 мл и более.

9. Пульверизатор.

Приготовление тонкого слоя и нанесение липидов. Хорошо вымытые, обезжиренные стеклянные пластинки закладывают в станок. На старт и на финиш станка кладут пластинки шириной не более 5—6 см. Все стекла еще раз протирают хлороформом. На старт помещают аппликатор с предварительно отрегулированной толщиной зазора (250—300 мкм для разделения липидов на классы и 350—500 мкм для разделения фосфолипидов на подклассы).

В коническую колбу емкостью 150—200 мл отвешивают силикагель (из расчета 5 г на одну пластинку 20×20 см) и заливают двойным объемом дистиллированной воды, закрывают пробкой и энергично встряхивают 90 с до однородной массы (без пузырьков), затем быстро выливают в аппликатор и непрерывным плавным движением прибора наносят слой силикагеля на стеклянные пластинки. Слой должен быть гладким, без пустот и наплывов.

Пластинки оставляют на ночь при комнатной температуре, а перед использованием их помещают в сушильный шкаф для активизации в течение 1—2 ч при 110°С. После охлаждения пластинки с нижнего ее края на 0,3—0,5 см удаляют силикагель, а на 1—1,5 см выше иглой намечают линию старта.

Пробы липидов наносят (осторожно!) микропипеткой или микрошприцем с иглой в виде отдельного пятна или полосы шириной 2—3 см. Расстояние от краев стекла составляет 2 см, а между пробами — 2—3 см. Рядом с пробой наносят раствор каждого свидетеля в отдельности или их смесь.

Хроматографическая камера и подвижная фаза. Хроматографическую камеру готовят следующим образом. Дно и внутренние ее стенки покрывают чистой фильтровальной бумагой и смачивают подвижной фазой, в которой будет проводиться разделение липидов. Это создает хорошее насыщение камеры парами подвижной фазы и улучшает разделение. Подвижную фазу наливают в камеру в таком объеме, чтобы хорошо пропитать фильтровальную бумагу и толщина слоя на дне составила 1—1,2 см. Камеру закрывают пришлифованной крышкой и ставят под вытяжной шкаф. В качестве подвижной фазы используют ряд смесей (табл. 8).

После того как хроматографическая камера насытится парами подвижной системы (10—20 мин), в нее вносят пластинку с нанесенными липидами, кото-

8. Состав подвижных фаз и соотношение в них отдельных компонентов (об/об)

Составные части	Подвижные фазы					
	1	2	3	4	5	6
Петролейный эфир (т. к. 40—60 °С)	85	80	82	90	85	—
Диэтиловый эфир (т. к. 36—37 °С)	15	20	18	10	—	30
Гексан	—	—	—	—	—	70
Ацетон	—	—	—	—	15	—
Уксусная кислота ледяная	1	1	1	1	—	2

рую ставят вертикально или с небольшим наклоном (около 60°) к стенке камеры. В прямоугольную камеру пластинки ставят по две в виде буквы V. Камеру быстро закрывают и оставляют при комнатной или пониженной температуре на 40—45 мин. Как только граница подвижной фазы достигнет линии на 1 см ниже верхнего края, пластинку быстро извлекают и подсушивают 10—15 мин в горизонтальном положении под вытяжным шкафом.

Для уточнения отдельных классов пластинки опрыскивают из пульверизатора водным раствором серной кислоты или спиртовым раствором фосфоромолибденовой кислоты и прогревают в сушильном шкафу при 180—200° до обугливания. Классы липидов выступают в виде черных пятен, в этих случаях они разрушаются (кроме фосфолипидов). Чтобы обнаружить липиды без разрушения, чаще используют пары йода. Несколько кристалликов йода насыпают в стеклянный бюкс, туда же добавляют несколько капель спирта и помещают в эксикатор. После того как произойдет некоторая возгонка йода, в эксикатор вносят пластинку и крышку плотно закрывают. Через 10—15 мин липиды выступают в виде ярко-желтых или коричневых пятен. Пластинку вынимают, пятна обводят иглой и после испарения йода (под вытяжным шкафом) их соскабливают и переносят в пробирки.

Анализ классов липидов можно проводить без экстракции растворителя в присутствии силикагеля, используя вышеизложенные методы исследования. Но перед определением оптической плотности содержимое пробирок центрифугируют для осаждения силикагеля. При необходимости экстрагировать липиды от силикагеля используют метанол для фосфолипидов и хлороформ — для глицеридов, НЭЖК и холестерина.

При использовании подвижной фазы № 1 и № 3 (табл. 8) классы липидов располагают в такой последовательности (от старта к финишу): фосфолипиды (остаются на старте), моно-, диглицериды, свободный холестерин, НЭЖК, триглицериды и, наконец, холестерин этерифицированный. При использовании подвижной фазы № 5 классы липидов располагают в несколько иной последовательности (табл. 9).

9. Значение Rf для отдельных липидных классов при использовании разных подвижных фаз

Классы липидов	Фаза № 1		Фаза № 5
	Липиды сыворотки крови	Липиды печени	Липиды сыворотки крови
Фосфолипиды	0,00	0,00	0,00
Моноглицериды	0,04	—	0,02
Диглицериды	0,08	0,08	0,40
Холестерин свободный	0,11	0,12	0,21
НЭЖК	0,20	0,23	0,07
Триглицериды	0,44	0,42	0,63
Холестерин этерифицированный	0,70	0,70	0,81

Для детектирования отдельных классов липидов на хроматографической пластинке в качестве свидетелей лучше всего использовать чистые препараты отдельных липидов. При отсутствии свидетелей можно пользоваться коэффициентом подвижности отдельных классов — Rf. Для его расчета замеряют общую длину разгонки на пластинке (от нижней до верхней границы), которую принимают за 100%, а затем замеряют местоположение отдельных классов (по центру пятна), рассчитывают их прохождение относительно всей длины разгонки и сравнивают со стандартом.

Для разделения фосфолипидов на подклассы используют то же оборудование и тот же принцип приготовления тонкого слоя, но слой должен быть толще — 450—500 мкм. Это связано с тем, что для количественного определения индивидуальных фосфолипидов по фосфору необходимо наносить на пластинку несколько больше липидов (5—10 мг).

В качестве подвижной фазы для разделения фосфолипидов методом одномерной хроматографии чаще всего применяют смесь хлороформ — метанол — вода в отношении 65 : 25 : 4 [или хлороформ — метанол — аммиак (25%-ный водный раствор) в том же отношении]. Хорошие результаты дает разделение фосфолипидов в смеси хлороформ — метанол — вода в отношении 70 : 30 : 5.

Концентрированный раствор липидов (5—10%-ный) наносят на пластинку в виде полосы шириной 1,5—2 см или более. Разгон фосфолипидов занимает около 1 ч. После подсушивания пластинки проводят детектирование и идентификацию отдельных подклассов фосфолипидов в парах йода или путем опрыскивания его 10%-ным раствором серной кислоты с последующим прогреванием в сушильном шкафу. Обугливание органической части молекулы отдельных фосфолипидов не влияет на количественное определение химическим путем фосфора.

Идентификацию индивидуальных фосфолипидов проводят с помощью свидетелей или по величине Rf в сопоставлении с литературными данными (табл. 10).

10. Значение величины Rf для фосфолипидов при разделении их в разных системах

Подклассы	Подвижные системы		
	1	2	3
Фосфатидиловая кислота	0,87		—
Цереброзиды	—	0,64(0,55)	0,79
Кардиолипин	0,77	0,55	0,84
Фосфатидилэтаноламин	0,52	0,45	0,58
Фосфатидилинозитол	0,40	0,11	0,20
Фосфатидилхолин	0,27	0,36	0,33
Фосфатидилсерин	0,21	0,06	0,10
Сфингомиелин	0,17	0,18	0,20
Лизолецитин	0,08	0,11	0,15
Старт	0,00	0,00	0,00

Значительную помощь в идентификации отдельных фосфолипидов оказывают специальные реакции. Так, фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин обнаруживают после опрыскивания раствором нингидрина: 3 г нингидрина растворяют в 5 мл лутидина (2,6-диметилпиридин) и добавляют 95 мл н-бутанола, насыщенного водой. Появляется малиновое окрашивание, характерное для аминогрупп.

Фосфолипиды, содержащие холин (фосфатидилхолин, лизофосфатидилхолин и сфингомиелин), окрашиваются в оранжевый цвет реактивом Драгендорфа, который готовят из двух растворов. Раствор I содержит 1,7 г $Bi(NO_3)_3 \cdot 5H_2O$ в 100 мг 20%-ного раствора уксусной кислоты. Раствор II содержит 40 г KJ в 100 мл веды. Пластинки опрыскивают смесью, состоящей из 4 мл раствора I и 1 мл раствора II с добавлением 20 мл воды.

Фосфатидилинозитол окрашивается в коричневый цвет аммиачным раствором серебра, состоящим из равных объемов 0,1 н. $AgNO_3$ и 1 н. NH_3.

Количество индивидуальных фосфолипидов после ТСХ определяют по содержанию в них фосфора по методике, описанной выше для фосфолипидов.

Поскольку разные подклассы фосфолипидов содержат неодинаковое количество фосфора, их соотношение в исследуемых материалах выражают в мкг (мг) или в процентах фосфора по отношению к его содержанию в общих фосфолипидах.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЛАССОВ ЛИПИДОВ МЕТОДОМ ДЕНСИТОМЕТРИИ

Принцип метода основан на фотометрии плотности окраски отдельных классов липидов, разделенных методом ТСХ, в отраженном или проходящем свете с последующим умножением на поправочный коэффициент.

Реактивы. 1. Пластинки «Силуфол», UV-254 (ЧССР) для качественного анализа методом ТСХ, размером 150×150 мм.

2. Подвижная фаза: петролейный эфир — диэтиловый эфир — уксусная кислота (85 : 15 : 1).

3. Стандартная смесь липидов в хлороформ-метаноле. Для ее приготовления используют фосфолипиды (синтетические или выделенные из яичного желтка ТСХ), холестерин, ч. д. а., НЭЖК (пальмитиновую или стеариновую кислоту или их смесь), триглицериды (триолеин), холестерин-эфир (холестерол-пальмитат или холестерол-олеат, ч. д. а.) в соотношении (%) 50 : 2 : 0,5 : 10 : 37,5 с общей концентрацией 1—3%.

4. 5%-ный раствор фосфорномолибденовой кислоты в этаноле (свежий).

Оборудование. Денситометр; хроматографическая камера; пульверизатор; сушильный шкаф; микрошприцы на 1—5 мкл; ножницы; вытяжной шкаф.

Ход определения. На активированную пластинку «Силуфол» микрошприцем наносят не более 6 проб липидов (по 0,06—0,1 мг) в виде тонкой полосы шириной 8—10 мм. После разделения липидов пластинку подсушивают в горизонтальном положении, опрыскивают спиртовым раствором фосфорномолибденовой кислоты и прогревают при 90—100°С до появления четко выраженных пятен сине-голубого цвета.

Регистрацию фракций проводят в день разделения. Для этого пластинку разрезают ножницами по числу нанесенных проб (но не шире 4 см), вкладывают в кассету денситометра, фиксируют по краям металлическими пластинками и записывают при красном светофильтре в отраженном свете. Каждый класс липидов на хроматограмме выписывают в виде пика.

Рассчитывают относительное содержание отдельных классов липидов по площади пика путем умножения его высоты на ширину на половине высоты от базисной линии. Поскольку получаемые данные не соответствуют фактическому содержанию отдельных классов липидов в анализируемых пробах, их следует множить на поправочный коэффициент, который находят следующим образом. Точный объем стандартной смеси наносят на пластинку в 10—15 повторностях, разгоняют при тех же условиях, что описаны выше, записывают на денситометре и высчитывают площадь каждого пика. Сумму всех пиков принимают за 100%, находят относительную долю каждого из них. Затем процентное содержание отдельных классов липидов в стандартной смеси делят на процентное содержание соответствующего класса, найденного с помощью денситометра.

Для каждого прибора и режима исследований должны быть найдены свои поправочные коэффициенты. Их величина может быть различной: например, для фосфолипидов — 2—6, холестерина свободного —0,25—0,5, НЭЖК — 0,8—1,2, триглицеридов — 0,7—0,9, эфиросвязанного холестерина — 0,6—0,7 и т. д.

Источник: 7

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МИНЕРАЛЬНОГО ОБМЕНА (МАКРОЭЛЕМЕНТОВ)

В ветеринарии для оценки состояния минерального обмена определяют содержание в крови общего кальция, ионизированного кальция, неорганического фосфора, неорганического магния, натрия, калия, используют показатели активности щелочной фосфатазы, содержания микроэлементов, паратгормона, кальцитонина, кальциферона и других веществ, имеющих непосредственную связь с минеральным обменом.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО КАЛЬЦИЯ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КОМПЛЕКСОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ С ИНДИКАТОРОМ ФЛУОРЕКСОНОМ (ПО ВИЧЕВУ, КАРАКАШЕВУ)

Принцип основан на том, что водные растворы флуорексона в сильнощелочной среде не флуоресцируют, но в этих же условиях с кальцием флуорексон образует флуоресцирующие комплексы.

Комплекс индикатора с металлом менее прочен, чем комплекс металла с трилоном Б, поэтому по мере добавления трилона Б к раствору, содержащему металл и индикатор, происходит постоянный переход ионов металла к трилону Б. При титровании трилоном Б в точке эквивалентности отмечается резкое затухание флуоресценции.

Реактивы. 1. 0,1 н. раствор трилона Б (комплексом III, ЭДТА). Готовят из стандарт-титра.

2. 0,005 н. раствор трилона Б. Готовят из 0,1 н. раствора трилона Б. 10 мл 0,1 н. раствора трилона Б в мерной колбе доводят дистиллированной водой до 200 мл. Устойчив 2 мес.

3. Индикаторная смесь: индикатор флуорексон (ч.д.а.) и калий хлористый (ч.д.а., х.ч.) в соотношении 1 : 100.

4. 1 н. раствор калия едкого (ч.д.а., х.ч.). Допускается примесь кальция не более 1 мг%.

5. Стандартный 100 мг%-ный раствор кальция: 2,497 г кальция углекислого (х.ч.), высушенного до постоянного веса при 100—120°, вносят в мерную колбу на 1 л, добавляют 3 мл концентрированной соляной кислоты и после растворения соли доводят бидистиллированной водой до метки; 1 мл раствора содержит 1 мг кальция.

6. Рабочий 10 мг%-ный раствор кальция. Готовят разведением 100 мг%-ного раствора кальция дистиллированной водой 1 : 10 (1 мл 100 мг%-ного раствора кальция и 9 мл воды). Рабочий раствор кальция необходим для установления затухания флуоресценции при титрации и контрольной проверки метода.

Оборудование. Микробюретка емкостью 2 мл с градуировкой на 0,01 мл, оканчивающаяся вытянутым капилляром с оттянутым концом, что дает возможность проводить титрование меньшими каплями; пипетки емкостью 1 и 10 мл; стаканчики для титрации. Посуду перед использованием выдерживают в разведенных растворах трилона Б и многократно промывают бидистиллированной водой.

Ход определения. В стаканчик вносят 20 мл дистиллированной воды, 5 мл раствора едкого калия и несколько кристалликов индикаторной смеси. Появляется флуоресценция, обусловленная присутствием в приготовленной смеси кальция.

Для связывания кальция в смесь из микробюретки добавляют по каплям раствор трилона Б до исчезновения флуоресценции и появления бледно-розового окрашивания. Обычно для этого требуется 1 капля раствора трилона Б. Большее количество свидетельствует о высокой концентрации кальция в растворе едкого калия и его непригодности для анализа. Примесь кальция в растворе может быть обусловлена некачественной подготовкой посуды или неисправностью дистиллятора.

После связывания кальция, находящегося в растворе едкого калия, в этот же стаканчик добавляют 0,5 мл сыворотки крови и снова оттитровывают раствором трилона Б до исчезновения флуоресценции и появления бледно-розового окрашивания.

Расчет ведут по формуле: Са (мг%) $= a \cdot 20$, где a — количество раствора трилона Б, пошедшее на титрование сыворотки крови (мл); 20 — коэффициент для пересчета в мг% при условии, что титр 0,005 н. раствора трилона Б равен 1.

Клиническое значение. Кальций преимущественно внеклеточный элемент. Около 99% его находится в составе костной ткани, где вместе с фосфором, натрием, магнием и другими элементами он образует кристаллы минерального компонента скелета — гидрооксиапатита. Остальное его количество находится во внеклеточной жидкости, главным образом в плазме крови.

Кальций — один из важнейших компонентов системы, регулирующей проницаемость мембран. Ионы кальция способствуют взаимодействию актина и миозина, то есть сокращению мышечных волокон. Этот эффект осуществляется с участием магния и АТФ. В нервно-мышечных синапсах ионы кальция способствуют выделению ацетилхолина и связыванию его с холин-рецептором, а при избытке ацетилхолина активизируют холинэстеразу, расщепляющую ацетилхолин. Ион кальция активирует процесс свертывания крови.

Всасывание кальция и фосфора из желудочно-кишечного тракта протекает с участием активных форм витамина D. Под общим кальцием понимают кальций, связанный с белками сыворотки крови (главным образом с альбуминами) и кислотами, а также ионизированный кальций. Наиболее активными формами кальция являются ионизированный кальций и кальций, связанный с лимонной, фосфорной и другими кислотами.

Уровень кальция в крови здоровых животных указан в приложении 6. Он зависит от содержания кальция, фосфора и витамина D в рационе, от состояния гормональной системы, желудочно-кишечного тракта, почек и других органов.

Понижается содержание кальция в крови при длительном недостаточном поступлении его с кормом, плохом усвоении вследствие дефицита витамина D и паратгормона. Последние обеспечивают всасывание кальция в кишечнике и препятствуют выведению его с мочой. Гипокальциемия сопровождает алиментарную остеодистрофию, рахит, вторичную остеодистрофию и многие другие болезни. Уровень кальция в крови стабильно удерживается длительное время за счет мобилизации его из костяка. Компенсаторные механизмы проявляются при развитии алиментарной остеодистрофии и рахита, при которых низкий уровень кальция в крови обнаруживают при затяжном, тяжелом течении патологического процесса.

Снижение кальция в крови при вторичной остеодистрофии связано, вероятно, с гипофункцией околощитовидных желез и недостаточным синтезом паратгормона. Резко выраженную гипокальциемию наблюдают при послеродовом парезе. Объясняется такое явление, очевидно, гиперсекрецией кальцитонина, вырабатываемого С-клетками щитовидной железы, который в противоположность паратгормону способствует минерализации кости и понижает уровень кальция в крови. Причиной гипокальциемии может быть гипофункция околощитовидных желез. Так как кальций участвует в нервно-мышечном возбуждении, то при его резком снижении появляются тонические, клонические судороги и парезы. Гипокальциемия возможна при нефрозе и нефрите, если наступает гипопротеинемия, а следовательно, потеря связанного с белком кальция.

Повышение кальция в крови может быть при передозировке витамина D, гиперфункции паращитовидных желез.

Источник: 16.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛЬЦИЯ В КОСТНОЙ ТКАНИ

Предварительно проводят озоление кости. Кость освобождают от мышц, сухожилий, связок, взвешивают. У трубчатых костей отпиливают суставные концы (эпифизы). Каждую из трех частей (два эпифиза и диафиз) распиливают вдоль и поперек (на четыре части).

Для анализа используют примерно $^1/_2$—$^1/_4$ от массы диафиза и эпифиза. Масса навески зависит от размера кости, но всегда нужно брать одинаковый процент от массы каждой части. Отобранный материал тщательно дробят и 10—15 г помещают в предварительно прокаленный и взвешенный до постоянной массы большой тигель. Кость обугливают, для этого тигель ставят на электроплитку с асбестовой сеткой (в вытяжном шкафу) и нагревают до тех пор, пока кость не перестанет дымить. После этого тигель помещают в муфельную печь и прокаливают 4—5 ч при темно-красном накаливании (450—500°С). Зола должна быть светло-серого или белого цвета, без примесей частиц угля. Остывший тигель переносят в эксикатор, затем взвешивают на тех же аналитических весах, вновь ставят в муфельную печь на 1—2 ч и снова взвешивают. Разница между первым и вторым взвешиванием не должна превышать 0,0002 г. При необходимости делают расчет сырой золы по формуле:

$$\text{Сырая зола} = \frac{100\,(a - б)}{H}\ \%,$$

где a — масса тигля с золой, г; $б$ — масса тигля, г; H — навеска, г.

Содержимое тигля переносят в фарфоровую ступку, измельчают в однородную массу. На аналитических весах взвешивают 1 г зольного остатка (взвеши-

вать лучше в ранее прокаленном и взвешенном тигле). Взятую навеску в том же тигле растворяют в 10 мл 25%-ного раствора соляной кислоты при постоянном перемешивании стеклянной палочкой. Полученный раствор переносят в мерную колбу на 250 мл. Тигель несколько раз обмывают дистиллированной водой и сливают в ту же колбу, объем ее доводят до метки дистиллированной водой. Содержимое колбы хорошо перемешивают и после отстаивания проводят анализ, как описано выше в методике определения общего кальция в сыворотке крови.

Источник: 38.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИОНИЗИРОВАННОГО КАЛЬЦИЯ РАСЧЕТНЫМ МЕТОДОМ (ПО Й. ТОДОРОВУ)

Ионизированный кальций определяют вычислением по следующей формуле:

$$Ca^{++}\ \text{мг}\ \% = \frac{6Ca - \frac{Б}{3}}{Б + 6},$$

где Ca^{++} — ионизированный кальций; Ca — общий кальций, мг%; Б — общий белок, г%. Для вычисления ионизированного кальция необходимо знать количество общего кальция и общего белка сыворотки крови.

Источник: 122.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИОНИЗИРОВАННОГО КАЛЬЦИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ ОБМЕННОЙ АДСОРБЦИИ (ПО Д. Т. ВОЛКОВУ)

В качестве адсорбента используют нейтральную окись алюминия, стандартизованную по Брохману, II степени активности. Ионизированный кальций — это разница между общим кальцием и кальцием, не вступившим в ионный обмен. Последний определяют следующим образом: к 2,5 мл плазмы (сыворотки) крови добавляют 50 мг адсорбента из расчета 20 мг окиси алюминия на 1 мл плазмы (сыворотки). Содержимое пробирки тщательно перемешивают стеклянной палочкой и центрифугируют 15 мин при 3000 об/мин. Надосадочный раствор осторожно сливают в пробирку, не допуская взмучивания осадка. Затем берут 0,1 мл полученного раствора и определяют содержание кальция по вышеописанной методике определения общего кальция.

Источник: 28.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕОРГАНИЧЕСКОГО ФОСФОРА В БЕЗБЕЛКОВОМ ФИЛЬТРАТЕ КРОВИ С ВАНАДАТ-МОЛИБДЕНОВЫМ РЕАКТИВОМ (ПО ПУЛСУ В МОДИФИКАЦИИ В. Ф. КОРОМЫСЛОВА И Л. А. КУДРЯВЦЕВОЙ)

Принцип. Фосфор в безбелковом фильтрате дает лимонно-желтое окрашивание с ванадат-молибденовым реактивом. Степень окраски измеряют на фотоэлектроколориметре.

Реактивы. 1. 20%-ный раствор трихлоруксусной кислоты.

2. Реактив на фосфор. Приготавливают смешиванием 500 мл 0,234%-ного раствора ванадата аммония, 1000 мл 2,5 н. (2,5 моль/л) раствора соляной кислоты и 1000 мл 3,53%-ного раствора молибденовокислого аммония. 0, 234%-ный раствор ванадата аммония готовят путем растворения 2,34 г вещества в 500 мл горячей дистиллированной воды, добавляют 28 мл концентрированной соляной кислоты плотностью 1,19, охлаждают до 20°С и доводят до 1 л дистиллированной водой. Для получения 3,53%-ного раствора молибденовокислого аммония 35,3 г соли растворяют в 700 мл дистиллированной воды, затем все

это количество переносят в мерную колбу на 1 л и дистиллированной водой доводят до метки. 2,5 моль/л раствора соляной кислоты готовят путем доведения 207,5 мл концентрированной соляной кислоты до 1 л дистиллированной водой.

Реактив на фосфор хранят в склянке из темного стекла 2 мес.

3. Основной стандартный раствор фосфора. 4,394 г однозамещенного фосфорного калия (KH_2PO_4, ч. д. а.), высушенного до постоянной массы в эксикаторе над концентрированной серной кислотой, растворяют в 1 л дистиллированной воды. 1 мл раствора содержит 1 мг фосфора.

4. 5 мг%-ный рабочий стандартный раствор фосфора. 5 мл основного стандартного раствора фосфора доводят в мерной колбе на 100 мл дистиллированной водой до метки.

Оборудование. Фотоэлектроколориметр; колбы конические термостойкие на 1 л; колбы мерные на 50, 100, 500, 1000 мл; электроплитка; пипетки, пробирки; центрифуга.

Ход определения. В центрифужную пробирку вносят 2,5 мл дистиллированной воды, 0,5 мл сыворотки, 2 мл раствора трихлоруксусной кислоты, перемешивают и через 10 мин центрифугируют 15 мин при 3000 об/мин. Центрифугат осторожно сливают в пробирку (он должен быть прозрачный, без хлопьев). В иных случаях его снова центрифугируют. Берут 2,5 мл прозрачного центрифугата и 2,5 мл реактива на фосфор, перемешивают, через 10 мин колориметрируют на ФЭКе с синим светофильтром в кювете толщиной слоя 1 см против дистиллированной воды. Параллельно готовят стандартную пробу: к 0,5 мл рабочего стандартного 5 мг%-ного раствора фосфора добавляют 2,5 мл дистиллированной воды и 2 мл раствора трихлоруксусной кислоты, смешивают. Затем берут 2,5 мл смеси, прибавляют 2,5 мл реактива на фосфор и через 10 мин колориметрируют в том же режиме, что и пробу сыворотки.

Расчет ведут по формуле:

$$X = \frac{A}{Б} \cdot 5,$$

где X — количество миллиграммов фосфора, содержащегося в 100 мл сыворотки; A — экстинкция испытуемого образца; $Б$ — экстинкция стандартного раствора; 5 — коэффициент для перевода в мг%.

Примечание. Исследование крови проводят в течение первых 2 дней после ее взятия.

Клиническое значение. Все виды обмена в организме неразрывно связаны с превращением фосфорной кислоты. Фосфор входит в структуру нуклеиновых кислот, благодаря фосфорилированию осуществляются кишечная адсорбция, гликолиз, прямое окисление углеводов, транспорт липидов, обмен аминокислот и т. д. Макроэргические фосфорные соединения, среди которых центральное место занимает АТФ и является универсальным донатором и аккумулятором энергии. 80—85% фосфора содержится в составе скелета. В крови фосфор находится в неорганической и органической формах. Органический фосфор связан с белками и липидами. Всего в крови животного и человека содержится 10 фракций фосфорных соединений.

В клинической практике диагностическое значение имеет неорганический фосфор. Нормативы его содержания в сыворотке (плазме крови) здоровых животных приведены в приложении 6.

Снижение фосфора в крови отмечают при длительном недостатке его в рационе, плохом усвоении или расстройствах желудочно-кишечного тракта или дефиците витамина D, а также при гиперфункции паращитовидных желез и гипофункции околощитовидной железы (когда увеличивается секреция паратгормона и уменьшается выработка кальцитонина), при алиментарной остеодистрофии, рахите, уровской болезни, пеллагре, длительном лечении инсулином, хлористым кальцием.

Повышение фосфора в крови может быть вызвано уменьшением секреции паратгормона, когда наступает торможение реабсорбции фосфора в почках. Увеличение кальцитонина стимулирует реабсорбцию фосфора в почках и приводит к гиперфосфатемии. Последняя встречается при сердечной недостаточности, кетозе, приеме больших доз витамина D, при нефритах, нефрозах, токсико-

лах беременности, мышечном перенапряжении. У телят молочного периода содержание фосфора в крови несколько выше, чем у взрослых животных. Содержание фосфора в безбелковом фильтрате цельной крови, плазмы и сыворотки обработанных одновременно одинаково.

Источник: 50

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАГНИЯ В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ ПО ЦВЕТНОЙ РЕАКЦИИ С ТИТАНОВЫМ ЖЕЛТЫМ (ПО КУНКЕЛЮ, ПИРСОНУ, ШВЕЙГЕРТУ В МОДИФИКАЦИИ И. В. ПЕТРУХИНА)

Принцип. Магний реагирует с титановым желтым в щелочной среде с образованием окрашенных соединений. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации магния.

Реактивы. 1. 20%-ный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ).

2. 0,01%-ный раствор титанового желтого. Готовят в день определения.

3. 0,02%-ный раствор поливинилового спирта.

4. Основной стандартный раствор магния. Растворяют 8,458 г хлористого магния ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) в дистиллированной воде и доводят в мерной колбе до 1 л: 1 мл раствора содержит 1 мг магния (100 мг%). Можно готовить 0,01 н. раствор магния сернокислого из стандарт-титра (фиксанала), который содержит 12,15 мг% магния.

5. Рабочий стандартный раствор с содержанием 2 мг% магния. Берут 1 мл основного раствора хлористого магния с содержанием 100 мг% и доводят в мерной колбе дистиллированной водой до 50 мл. При использовании в качестве основного раствора 0,01 н. раствора магния сернокислого его разводят 1 : 6 (1 мл раствора с содержанием 12,15 мг% магния+5 мл дистиллированной воды), получают раствор с содержанием 2,02 мг% магния.

6. 2 н. (2 моль/л) раствор едкого натра. 80 г едкого натра растворяют в мерной колбе и доводят дистиллированной водой до 1 л.

Оборудование. Фотоэлектроколориметр; центрифуга; пробирки центрифужные.

Ход определения. В центрифужную пробирку вносят 1 мл сыворотки (плазмы), 1 мл раствора трихлоруксусной кислоты, тщательно перемешивают стеклянной палочкой и через 10 мин центрифугируют при 5000 об/мин 15 мин или при 3000 об/мин 20 мин. Надосадочная жидкость должна быть прозрачной. Ее осторожно сливают в пробирку. К 0,5 мл центрифугата добавляют 1 мл раствора титанового желтого, 1 мл раствора поливинилового спирта и 2 мл раствора едкого натра, перемешивают.

Таким же образом готовят стандартную пробу: в пробирку вносят 1 мл стандартного рабочего раствора магния (2 мг%), 1 мл раствора ТХУ, перемешивают. Из этой смеси берут 0,5 мл, добавляют 1 мл раствора титанового желтого, 1 мл раствора поливинилового спирта и 2 мл раствора едкого натра, смешивают. Параллельно готовят контроль на реактивы: в пробирку вносят 2 мл дистиллированной воды, 2 мл раствора ТХУ, 2 мл раствора титанового желтого, 2 мл раствора поливинилового спирта и 4 мл раствора едкого натра, перемешивают. Через 10 мин опытную и стандартную пробы колориметрируют в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 500—560 нм (зеленый светофильтр) против контроля на реактивы. Расчет ведут по формуле: Xмг% = $= (A : Б) \cdot 2$, где A—экстинкция опытной пробы; $Б$—экстинкция стандартного рабочего раствора магния; 2 — коэффициент для пересчета в мг%. При использовании стандартного раствора с содержанием 2,02 мг% магния в качестве коэффициента используют эту величину.

Клиническое значение. Магний, так же как и кальций, является основным катионом внутриклеточной среды. Его концентрация в клетках в 10—15 раз выше, чем во внеклеточной жидкости. В клетках ионы магния образуют комплексы с белками и нуклеиновыми кислотами. В митохондриях клеток магний активирует процессы окислительного фосфорилирования. Он активизирует ДНК-полимеразу, РНК-полимеразу, рибонуклеазу и другие ферменты. Магний необходим для формирования костной ткани (активация ферментов цикла три-

карбоновых кислот и щелочной фосфатазы). Магний усиливает расщепление ацетилхолина путем активации холинэстеразы. При снижении магния в крови увеличивается (достигая предела) концентрация ацетилхолина, при которой блокируется передача нервного возбуждения, наступают тетания и судороги. Магний тесно связан с обменом кальция, фосфора и калия. Более 60% магния находится в костях и зубах.

Содержание магния в сыворотке (плазме) крови здоровых животных колеблется от 2 до 3,5 мг% (приложение 6).

Снижение магния в крови отмечают при пастбищной тетании (1,5—1,2 мг% и ниже), алиментарной остеодистрофии, послеродовом парезе, транспортной болезни у коров. Гипомагнемия проявляется при поступлении в организм избытка калия (с молодой травой) или азота с концентрированными кормами, а также азотсодержащими небелковыми средствами.

Источники: 73, 89.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛИЯ И НАТРИЯ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ МЕТОДОМ ПЛАМЕННОЙ ФОТОМЕТРИИ

Принцип. Распыленную в воздухе биологическую жидкость вводят в горящую газовую смесь с высокой температурой. В этих условиях многие металлы имеют характерные для них спектры излучения, интенсивность которых зависит от концентрации элементов. На пути излучения ставят светофильтры, пропускающие волну определенной длины. Свет, прошедший через светофильтр, попадает на селеновый фотоэлемент, где преобразуется в электрический ток, измеряемый гальванометром. Между концентрацией вещества, содержащегося в исследуемом растворе, и отклонениями шкалы гальванометра имеется определенная связь, которая устанавливается путем анализа стандартных растворов калия или натрия при определенном давлении газа.

Реактивы. 1. Основные калибровочные растворы для определения натрия, калия в плазме (сыворотке), спинномозговой жидкости, экссудатах, транссудатах, желудочном содержимом, эритроцитах. Готовят эти растворы из химически чистых солей натрия хлорида, калия хлорида, кальция карбоната, дважды перекристаллизованных и высушенных до постоянной массы. а) Стандартный раствор натрия основной. 2,5418 г хлористого натрия, высушенного до постоянной массы при температуре 105°С, растворяют в 1 л бидистиллированной воды. В 1 мл раствора содержится 1 мг натрия. б) Стандартный раствор калия основной. 1,9069 г хлористого калия, высушенного до постоянной массы при температуре 105°С, растворяют в 1 л бидистиллированной воды. В 1 мл раствора содержится 1 мг калия. в) 2,4972 г углекислого кальция растворяют в 50 мл 1н. (1 моль/л) раствора соляной кислоты в мерной колбе на 1 л и доводят бидистиллированной водой до метки.

2. Основные калибровочные растворы для определения калия в моче. а) 22,285 г сернокислого калия растворяют в мерной колбе на 1 л в небольшом количестве бидистиллированной воды и доводят объем до метки. б) 127,09 г хлористого натрия растворяют в небольшом количестве бидистиллированной воды в мерной колбе на 1 л и доводят бидистиллированной водой до метки.

3. Гепарин (антикоагулянт).

Оборудование. Пламенный фотометр; компрессор; колбы мерные; бюксы диаметром 10—15 мм; баллоны с ацетиленом; флаконы пенициллиновые.

Подготовка материала к анализу. 1. Плазму получают в течение первого часа (но не позже 4) после отбора проб крови. В качестве антикоагулянта используют 1%-ный раствор гепарина из расчета 2 капли на 10 мл крови. Кровь центрифугируют 15 мин при 3000 об/мин.

2. Для определения калия 0,5 мл плазмы вносят в пенициллиновый флакончик, добавляют из бюретки 9,5 мл дистиллированной воды, закрывают флакон резиновой пробкой и тщательно перемешивают. Разведение соответствует 1 : 20.

3. Для определения натрия плазму крови разводят 1 : 100, для чего 1 мл разведенной 1 : 20 плазмы вносят в другой флакончик и приливают 4 мл дистиллированной воды. Можно готовить разведение плазмы 1 : 150.

4. Эритроциты. Гепаринизированную кровь центрифугируют 30 мин при 3000 об/мин. Плазму с верхним слоем эритроцитов отсасывают. Эритроциты набирают пипеткой из нижней части пробирки, разводят дистиллированной водой в соотношении 1 : 260. Для определения натрия разведение эритроцитов делают 1 : 20, спинномозговую жидкость, экссудат, транссудат разводят дистиллированной водой 1 : 10.

5. Желудочное содержимое предварительно разводят дистиллированной водой 1 : 50, а затем делают разведение дистиллированной водой 1 : 10.

6. Моча. Собирают суточную мочу, измеряют ее количество. Небольшое количество мочи центрифугируют, разводят дистиллированной водой 1 : 100.

Ход определения согласно инструкции, прилагаемой к прибору. При включении прибора сначала пропускают сжатый воздух, потом ацетилен или другой газ. В бюксы диаметром 10—15 мм вносят подготовленную биологическую жидкость и соответствующий рабочий калибровочный раствор. Исследование начинают с настройки прибора.

Во время прогревания прибора в пламя горелки подают дистиллированную воду и при помощи корректора устанавливают шкалу гальванометра на «нуль». В распылитель подают рабочие стандартные растворы, каждый не менее 2 раз, и записывают показания прибора. Капилляр промывают дистиллированной водой и в пламя горелки подают исследуемые пробы, также не менее 2 раз. Показания прибора заносят в журнал. Через каждые 5—6 проб распылитель промывают дистиллированной водой до тех пор, пока шкала гальванометра не установится на «нуль», и подают в распылитель рабочие стандартные растворы, в пределах которых укладываются показания исследуемых проб.

После исследования капилляр распылителя промывают 20 мин дистиллированной водой, отключают последовательно газ и воздух, выключают прибор из электросети, закрывают диафрагму и фотоэлемент, снимают светофильтры.

Расчет ведут по калибровочному графику. Для его построения из основных калибровочных растворов готовят рабочие растворы, как указано в таблице 11—16.

11. Рабочие калибровочные растворы для определения калия в плазме (сыворотке), спинномозговой жидкости, транссудате, экссудате, желудочном содержимом

Основные калибровочные растворы, мл			Дистиллированная вода, мл	Концентрация калия в калибровочном растворе	
KCl	NaCl	$CaCO_3$		мг%	ммоль/л
1,2	16,5	0,2	82,1	12	3,08
1,6	16,5	0,4	81,5	16	4,10
2,0	16,5	0,5	81,0	20	5,12
2,4	16,5	0,6	80,5	24	6,15
2,8	16,5	0,8	79,9	28	7,18

12. Рабочие калибровочные растворы для определения калия в эритроцитах

Основной калибровочный раствор, мл	Дистиллированная вода, мл	Концентрация калия			
		в калибровочной пробе		в эритроцитах	
		мг%	ммоль/л	мг%	ммоль/л
1,0	До 100	1,0	0,256	260	66,6
1,1	До 100	1,1	0,282	286	73,3
1,2	До 100	1,2	0,307	312	80,0
1,3	До 100	1,3	0,333	338	86,0
1,4	До 100	1,4	0,359	364	93,0
1,5	До 100	1,5	0,384	390	100,0
1,6	До 100	1,6	0,412	416	106,6

13. Рабочие калибровочные растворы для определения калия в моче

Основной калибровочный раствор K_2SO_4, мл	Основной калибровочный раствор NaCl, мл	Дистиллированная вода, мл	Концентрация K и Na в калибровочной пробе
5	4	До 100	50 мг K + 200 мг Na
10	4	До 100	100 мг K + 200 мг Na
15	4	До 100	150 мг K + 200 мг Na
20	4	До 100	200 мг K + 200 мг Na
25	4	До 100	250 мг K + 200 мг Na
30	4	До 100	300 мг K + 200 мг Na

14. Рабочие калибровочные растворы для определения натрия в плазме (сыворотке) спинномозговой жидкости, транссудате, экссудате, желудочном содержимом

Основной калибровочный раствор NaCl, мл	Дистиллированная вода, мл	Концентрация натрия в калибровочной пробе	
		мг%	ммоль/л
2,6	97,4	260	113,0
2,8	97,2	280	121,7
3,0	97,0	300	130,4
3,4	96,6	340	147,8
3,8	96,2	380	165,2
4,0	96,0	400	174,3
4,2	95,8	420	182,6

15. Рабочие калибровочные растворы для определения натрия в эритроцитах

Основные калибровочные растворы		Дистиллированная вода, мл	Концентрация натрия			
			в калибровочной пробе		в эритроцитах	
NaCl, мл	KCl, мл		мг%	ммоль/л	мг%	ммоль/л
0,4	14	До 100	0,4	0,174	10,4	4,52
0,5	14	До 100	0,5	0,217	13,0	5,65
1,0	14	До 100	1,0	0,434	26,0	11,3
1,5	14	До 100	1,5	0,652	39,0	16,9
2,0	14	До 100	2,0	0,869	52,0	22,6
2,5	14	До 100	2,5	1,086	65,0	28,2

16 Рабочие калибровочные растворы для определения натрия в моче

Основной калибровочный раствор, NaCl, мл	Основной калибровочный раствор K_2SO_4, мл	Дистиллированная вода, мл	Концентрация N и K в калибровочной пробе
2	15	До 100	100 мг Na + 150 мг K
3	15	До 100	150 мг Na + 150 мг K
4	15	До 100	200 мг Na + 150 мг K
5	15	До 100	250 мг Na + 150 мг K
6	15	До 100	300 мг Na + 150 мг K
7	15	До 100	350 мг Na + 150 мг K

Рабочие калибровочные растворы обрабатывают, как опытные пробы, и по полученным данным строят калибровочный график.

Для расчета количества калия и натрия в моче показания калибровочного графика умножают на суточное количество мочи (в мл) и результат выражают в граммах.

Концентрация калия и натрия в биологической жидкости в миллимолях/л равна: CK, где C — концентрация калия (натрия) в ммолях, найденная по калибровочному графику; K — разведение биологической жидкости.

Клиническое значение. Нормативы калия и натрия в крови здоровых взрослых животных приведены в приложении 6. У собак, кошек, овец содержание калия в эритроцитах в 2,5—3 раза выше, чем в плазме, а у большинства моногастричных животных — в 20 раз и более. Концентрация калия в плазме крови новорожденных животных несколько выше, чем у взрослых. Натрий в основном внеклеточный элемент, более 80% его находится во внеклеточном пространстве. Однако у собак и жвачных натрий в эритроцитах преобладает над калием, у остальных животных — наоборот. Натрий в основном участвует в поддержании осмотического давления внеклеточной жидкости, является важным компонентом буферных систем, играет важную роль в поддержании жизнедеятельности микрофлоры рубца.

Изменение концентрации натрия и калия в крови сопровождается нарушением кислотно-щелочного равновесия. Потеря натрия в организме сопровождается дегидратацией. Уменьшение или увеличение содержания натрия в организме сопровождается соответствующим изменением количества воды, поэтому обессоливание и обезвоживание почти всегда понимают как синонимы.

Снижение натрия в плазме крови отмечают при длительном солевом голодании, поступлении с кормом большого количества калия, заболеваниях почек, чрезмерном потоотделении, при поносах, обильном питье, регидратации организма большим количеством безнатриевой жидкости.

Гипонатриемию наблюдают при лихорадочном состоянии, пневмонии, хроническом нефрите.

Повышение натрия в плазме крови отмечают при повышенном диурезе, ограничении питья, гиперфункции коры надпочечников и др.

Снижается калий в крови (гипокалиемия) при усиленном выделении его с мочой (гиперфункция коры надпочечников и передней доли гипофиза), при диарее, ацидозах, когда место выхождения из клеток ионов калия занимают ионы натрия. Уровень калия в крови не всегда тождествен с таковым в тканях: при уменьшении калия в тканях уровень этого элемента в крови может быть высоким. Такое явление бывает при сгущении крови, когда наступает относительная гиперкалиемия. Гипокалиемия часто наблюдается при токсикозах у новорожденных животных, тяжелых формах диспепсии, сопровождаемых выраженным ацидозом, при сахарном диабете, введении инсулина, больших количеств растворов глюкозы, поваренной соли.

Гиперкалиемия встречается при поедании большого количества молодой травы или зеленой массы растений, выращенных на угодьях, обильно удобренных калийными удобрениями, то есть при пастбищной терапии. Она может быть как следствие ацидоза, когда водородные ионы переходят из плазмы в клетки, обмениваясь на калий, а также при поражении почек, которые не могут выводить все поступающие с кормом электролиты.

Источники: 23, 56, 71, 73

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ

Помимо анализа рационов, для определения в организме животных микроэлементов нередко проводят анализы по установлению их количества в крови, молоке и других биологических объектах. Для этого используют как инструментальные (атомно-абсорбционные), так и химические методы исследования.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОБАЛЬТА В КРОВИ ПО МЕТОДУ С. И. ГУСЕВА В МОДИФИКАЦИИ А. А. ТИТОВОЙ

Принцип. Метод основан на получении окрашенного комплекса кобальта с 2-(2-пиридилазо)-5-диэтилметаминофенолом (ПААФ) при pH 5, экстракции его хлороформом и измерении оптической плотности среды. Для устранения влияния других микроэлементов, реагирующих с ПААФ, их окрашенные комплексы разрушают 10 н. (5 моль/л) раствором серной кислоты.

Реактивы. 1. 20%-ный раствор натрия лимоннокислого, х. ч.

2. 3. моль/л раствор натрия уксуснокислого трехводного, х. ч. 408 г. соли растворяют в бидистиллированной воде и доводят объем до 1 л.

3. 0,3 н. (0,3 моль/л) раствор соляной кислоты. В мерную колбу на 1 л вносят 24 мл концентрированной соляной кислоты (плотность 1,19) и доливают до метки бидистиллированной водой.

4. 0,05%-ный раствор ПААФ. 50 мг реактива растворяют в 100 мл 96%-ного этилового спирта.

5. Азотная кислота концентрированная, х. ч.

6. 10 н. (5 моль/л) раствор серной кислоты. Берут 266,3 мл серной кислоты (плотность 1,84) и доводят до 1 л бидистиллированной водой.

7. Хлороформ.

8. Стандартный раствор кобальта основной. 0,4034 г хлористого кобальта ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$, х.ч.) растворяют в бидистиллированной воде, добавляют 5 мл концентрированной соляной кислоты и доводят объем бидистиллированной водой до 1 л. В 1 мл стандартного раствора содержится 100 мкг кобальта.

9. Рабочий стандартный раствор кобальта. 1 мл основного стандартного раствора разводят до 100 мл 0,3 н. раствором соляной кислоты. В 1 мл содержится 1 мкг кобальта.

10. 20%-ный раствор соляной кислоты. Берут 48,2 мл соляной кислоты (плотность 1,19) и доводят до 100 мл бидистиллированной водой.

Оборудование. Фотоэлектроколориметр; фарфоровые тигли или чашки; сушильный шкаф; весы аналитические, электроплитка, муфельная печь; водяная баня; бюретка на 25 мл; пипетки измерительные на 0,2; 1,5 и 10 мл.

Ход определения. В фарфоровый тигель (или чашку) вносят 20 мл цельной крови, ставят его на электроплитку и медленно обугливают. Далее озоляют в муфельной печи в течение 4 ч при температуре 500—550°С. В теплый тигель приливают 2 мл 50%-ной азотной кислоты, тщательно перемешивают стеклянной палочкой, смывая в тигель приставшие к ней частицы бидистиллированной водой. Упаривают досуха на электроплитке или водяной бане, не допуская разбрызгивания содержимого. Тигель ставят в муфельную печь, доводят температуру до 500°С и выдерживают 1 ч. При наличии частичек угля обработку азотной кислотой повторяют. К золе приливают 2,5 мл 20%-ного раствора соляной кислоты и 5 мл бидистиллированной воды. Тигель накрывают часовым стеклом, ставят в водяную баню и кипятят 5 мин. Содержимое тигля фильтруют в мерную колбу на 25 мл. Тигель обмывают несколько раз бидистиллированной водой и объем доводят до метки. В делительную воронку (или пробирку с притертой пробкой) на 45—50 мл вносят 10 мл раствора золы, 2,5 мл 20%-ного раствора лимоннокислого натрия, 2,5 мл 3 моль/л раствора уксуснокислого натрия, 1 мл раствора ПААФ, тщательно перемешивая после прибавления каждого реактива. Через 10 мин приливают 10 мл 10 н. раствора серной кислоты, перемешивают, добавляют 5 мл хлороформа из бюретки и встряхивают 1 мин. Дают слоям жидкости хорошо разделиться и нижний слой сливают в кювету с толщиной слоя 1 см. При использовании пробирок с притертыми пробками нижний слой отбирают пипеткой с грушей или отсасывают верхний слой при помощи водоструйного насоса.

Фотометрируют при длине волны 570 нм (фильтр № 7) в кювете с указанной толщиной слоя против контроля.

Содержание кобальта вычисляют по калибровочному графику. В делительные воронки (или пробирки с притертыми пробками) вносят 0,2; 0,4; 0,8; 1; 1,5; 2 мл рабочего стандартного раствора кобальта. Объем доводят до 10 мл 0,3 н. соляной кислотой. Далее поступают, как и с образцом. В контроль вместо раствора кобальта вносят 0,3 н. соляную кислоту.

По результатам измерений строят калибровочную кривую. Расчет ведут по формуле:

$$\text{Кобальт, мкг \%} = \frac{aV \cdot 100}{bc},$$

где a — количество мкг кобальта, найденное по калибровочной кривой; $в$ — количество крови, мл; V — объем раствора золы, мл; c — количество раствора золы, взятое на анализ, мл; 100 — коэффициент для пересчета в мкг%.

Клиническое значение. Кобальт является составной частью витамина B_{12}, который в организме принимает непосредственное участие во многих обменных процессах. Он необходим для нормального кровотворения (активирует синтез протопорфирина), для синтеза метионина, ацетата, участвует в процессе переноса кислорода. Кобальт нужен для жизнедеятельности микрофлоры рубца. Он оказывает активирующее влияние на щелочную фосфатазу костной ткани. Поэтому его недостаток приводит к нарушению гемопоэза, усвоению питательных веществ корма, задержке роста и развития, снижению продуктивности и воспроизводительной функции, появлению гипокобальтоза, остеодистрофии, анемии, стеатозу печени и другим болезням.

Содержание кобальта в цельной крови колеблется от 2,5 до 5 мкг% (приложение 6), в плазме крови — от 0,5 до 0,7, в молоке — от 1 до 4 мкг%. Снижение кобальта в крови отмечают при его недостаточном поступлении с кормом и водой, плохом усвоении из-за расстройства желудочно-кишечного тракта. Низкий уровень кобальта наблюдают при гипокобальтозе, гиповитаминозе B_{12}, алиментарной остеодистрофии, энзоотической остеодистрофии, уровской болезни.

Источник: 73.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЙОДА, СВЯЗАННОГО С БЕЛКОМ (СБЙ), В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПО АКЛАНДУ В МОДИФИКАЦИИ С. В. СИЛАЕВОЙ

Принцип. Йод в присутствии церийарсенита образует окрашенное соединение, интенсивность которого измеряют на фотоэлектроколориметре.

Реактивы. 1. 10%-ный раствор сернокислого цинка. 10 г вещества растворяют в 90 мл бидистиллированной воды.

2. 0,5 н. (0,5 моль/л) раствор едкого натра. 20 г едкого натра вносят в мерную колбу и доливают бидистиллированной водой до 1 л.

3. 4 н. (2 моль/л) раствор углекислого натрия. Берут 21,2 углекислого натрия безводного и доводят в мерной колбе на 100 мл бидистиллированной водой до метки.

4. 2 н. (2 моль/л) раствор соляной кислоты. Готовят из фиксанала, разводят его бидистиллированной водой в мерной колбе на 500 мл или же берут 82 мл концентрированной соляной кислоты (плотность 1,19) и доводят ее бидистиллированной водой до 500 мл.

5. 10%-ный раствор серной кислоты. К 94,5 мл бидистиллированной воды приливают 5,5 мл концентрированной серной кислоты плотностью 1,84.

6. Раствор мышьяковистого ангидрида. 3,8 г мышьяковистого ангидрида растворяют в 50 мл 1 н. (1 моль/л) раствора едкого натра, добавляют 50 мл бидистиллированной воды и доводят объем до 500 мл 3,5 н. раствором серной кислоты. Ядовит. Хранят в темном месте в эксикаторе.

7. 3,5 н. (1,75 моль/л) раствор серной кислоты. 97,7 мл концентрированной серной кислоты (плотность 1,84) доводят до 1 л бидистиллированной водой.

8. Стандартный раствор йода. Раствор А готовят из фиксанала йодистого калия. В 1 мл 0,1 н. раствора йодистого калия содержится 12,68 мг йода. Раствор В: 2 мл раствора А доводят бидистиллированной водой до 1 л. В 1 мл содержится 25,38 мкг йода. Раствор С: 4 мл раствора В доводят бидистиллированной водой до 500 мл. В 1 мл содержится 0,202 мкг йода. Раствор Д: 10 мл раствора С доводят бидистиллированной водой до 100 мл. В 1 мл содержится 0,02 мкг йода.

9. Раствор сульфата церия. Берут 39 г аммонийцерийсульфата и растворяют в 1 л 3,5 н. раствора серной кислоты.

10. 1 н. (1 моль/л) раствор едкого натра. 40 г едкого натра в мерной колбе доводят бидистиллированной водой до 1 л.

Оборудование. Фотоэлектроколориметр; кварцевые пробирки центрифужные; ультратермостат или водяная баня, поддерживающая температуру 37°С; секундомер; муфельная печь.

Ход определения. В кварцевую центрифужную пробирку вносят 1 мл сыворотки крови, 7 мл бидистиллированной воды, 1 мл 10%-ного раствора сернокислого цинка и 1 мл 0,5 н. раствора едкого натра. После внесения каждого реактива тщательно перемешивают стеклянной палочкой. Через 30 мин центрифугируют в течение 15 мин при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость осторожно сливают. Осадок промывают 10 мл бидистиллированной воды с последующим центрифугированием и удалением жидкости. Промывание проводят трижды.

К осадку добавляют 1 мл 4 н. раствора углекислого натрия, перемешивают стеклянной палочкой. Осадок высушивают 10—12 ч (в сушильном шкафу) при температуре 100°С, а затем сжигают в муфельной печи при температуре 400—450°С. Пробирки охлаждают, к золе добавляют 1 мл 2 н. раствора соляной кислоты и 5 мл бидистиллированной воды. Тщательно перемешивают стеклянной палочкой 20—30 мин. Центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин. В опытную пробирку вносят 3 мл центрифугата, 1 мл бидистиллированной воды, 0,5 мл раствора мышьяковистого ангидрида и 1 мл 3,5 н. раствора серной кислоты.

В контрольную пробу берут 3,5 мл бидистиллированной воды, 0,5 мл 2 н. раствора соляной кислоты, 0,5 мл раствора мышьяковистого ангидрида и 1 мл 3,5 н. раствора серной кислоты, сливают осторожно, обмывают ею стенки пробирок, перемешивают и ставят в ультратермостат или водяную баню при температуре 37°С. Вместе с образцами в термостат помещают пробирку с раствором сульфата церия. Через 10 мин в каждую пробирку (не вынимая из термостата) с интервалом в 1 мин (по секундомеру) вносят 0,5 мл раствора сульфата церия и перемешивают. Фотометрируют через 12 мин (точно!) на ФЭКе при синем светофильтре (434 нм на спектрофотометре) в кювете с толщиной слоя 1 см против контроля, поочередно вынимая пробирки из термостата с интервалом в 1 мин.

Расчет результатов проводят по калибровочному графику. В 4 пробирки (№ 1, 2, 3, 4) вносят по 0,5 мл 2 н. раствора соляной кислоты. В пробирку № 1 добавляют 3,5 мл бидистиллированной воды, № 2—2,5 мл бидистиллированной воды и 1 мл стандартного раствора D (0,02 мкг йода), № 3—1,5 мл бидистиллированной воды и 2 мл раствора D (0,04 мкг йода), № 4 — 0,5 мл бидистиллированной воды и 3 мл раствора D (0,06 мкг йода). Во все пробирки вливают по 0,5 мл раствора мышьяковистого ангидрида и по 1 мл 3,5 н. раствора серной кислоты, а затем производят все операции, как и с образцами.

Калибровочный график строят на полулогарифмической бумаге. Величину экстинкции откладывают в логарифмическом, а количество йода — в миллиметровом масштабе. Найденное по графику количество йода в мкг умножают на коэффициент 200, чтобы получить мкг%.

Примечания. 1. В комнате, где проводят анализы, не должно быть следов йода. 2. Посуда и пробирки должны быть тщательно вымыты, а все реактивы химически чистыми. 3. Используют только бидистиллированную воду, полученную с помощью стеклянного (на шлифах) перегонного аппарата.

Клиническое значение. Образование тироксина и трийодтиронина происходит в фолликулярных клетках щитовидной железы из аминокислоты тирозина и неорганического йода. Органический йод плазмы крови представлен в основном гормонами щитовидной железы, связанными с глобулинами и частично с альбуминами. Связанный с белком йод плазмы крови (СБЙ) на 90—95% состоит из тироксина, поэтому его уровень в крови служит критерием для оценки функционального состояния щитовидной железы. Йод необходим для нормальной жизнедеятельности многих микроорганизмов желудочно-кишечного тракта.

У здоровых взрослых животных содержание СБИ составляет 4—8 мкг% (приложение 6), у телят первого дня жизни — 20,3, на третьи сутки — 12,2 мкг/100 мл. При тиреотоксикозе содержание СБИ выше 8,5 мкг%, при гипотиреозе — менее 3 мкг%. Снижение уровня СБИ отмечают при кетозе коров, при недостаточном поступлении йода с кормом и водой, энзоотическом зобе (3 мкг% и ниже).

Источник: 73.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАРГАНЦА В КРОВИ ПЕРЙОДАТНЫМ МЕТОДОМ

Принцип. Перйодат калия в кислой среде способен окислять марганец до MnO_4; мешающие вещества (восстановители) удаляются или разрушаются в процессе обработки золы.

Реактивы. 1. 1%-ный раствор калия метаперйодата (KJO_4, х. ч.), 10 г калия йоднокислого мета вносят в химический стакан, добавляют 400 мл бидистиллированной воды и 100 мл 85%-ной фосфорной кислоты (орто, х. ч.). Смесь подогревают до растворения калия метаперйодата, охлаждают, переносят в мерную колбу и доводят до 1 л бидистиллированной водой.

2. Растворитель. В мерную колбу на 1 л вносят 100 мл концентрированной азотной кислоты (х. ч.), 50 мл 1%-ного раствора метаперйодата калия и доводят бидистиллированной водой до отметки.

3. Стандартный раствор марганца основной. 0,4388 г перекристаллизованного сернокислого марганца (х.ч.) растворяют в 1 л бидистиллированной воды. В 1 мл содержится 100 мкг марганца.

4. Рабочий стандартный раствор марганца. 10 мл основного стандартного раствора доводят до метки в мерной колбе на 100 мл бидистиллированной водой. В 1 мл содержится 10 мкг марганца.

5. 50%-ный раствор азотной кислоты.

6. 10%-ный раствор азотной кислоты.

7. Азотная кислота концентрированная, х. ч.

Оборудование. 1. Тигли фарфоровые; весы аналитические; муфельная печь; электроплитка; фотоэлектроколориметр; пробирки из термостойкого стекла объемом 35—40 мл; водяная баня.

Ход определения. В фарфоровый тигель вносят 10 мл цельной крови и медленно на электроплитке доводят до обугливания. Тигель переносят в муфельную печь с температурой до 500—550°С и озоляют в течение 2 ч. 2—3 раза золу в тигле обрабатывают 50%-ной азотной кислотой (2—3 мл идет на первую обработку и по 1—2 мл — на последующие). Содержимое тигля выпаривают на электроплитке. Далее обработку повторяют, добавляя 1 мл кислоты. В золу вносят 10 мл растворителя, подогревают и помешивают стеклянной палочкой. Фильтруют в пробирку с меткой на 25 мл. Фильтр предварительно увлажняют бидистиллированной водой. Тигель ополаскивают 5 мл бидистиллированной воды с последующим фильтрованием в эту же пробирку. К фильтрату добавляют 10 мл 1%-ного раствора метаперйодата калия и кипятят на водяной бане 1 ч. Содержимое тигля охлаждают и объем доводят бидистиллированной водой до 25 мл, перемешивают. Через 1 ч фотометрируют на ФЭКе при зеленом светофильтре (длина волны 540 нм) в кювете с толщиной слоя 10 мм против контроля (10 мл растворителя, 5 мл бидистиллированной воды, 10 мл раствора метаперйодата калия; смесь кипятят 1 ч).

Содержание марганца рассчитывают по калибровочной кривой. В пробирку, куда внесено по 10 мл растворителя, добавляют по 0,5; 1; 2; 3; 4 и 5 мл рабочего стандартного раствора марганца. Объем доводят бидистиллированной водой до 15 мл, прибавляют 10 мл раствора метаперйодата калия. Пробы кипятят 1 ч. Далее поступают, как с образцами. Содержание марганца в пробах составляет соответственно 5, 10, 20, 30, 40 и 50 мкг. Расчет проводят по формуле:

$$\text{Марганец, мкг \%} = \frac{a \cdot 100}{v}$$

где *а* — количество марганца по калибровочной кривой, мкг; *в* — количество крови, мл; 100 — коэффициент пересчета в мкг%.

Клиническое значение. Действие марганца в организме разнообразное. Он является активатором щелочной фосфатазы, аргиназы, пируваткарбоксилазы, оксалацитат карбоксилазы и многих других ферментов, участвует в окислительно-восстановительных процессах, тканевом дыхании, костеобразовании. При его недостатке отмечаются задержка роста, остеодистрофия, нарушение репродуктивной функции, расстройства нервной системы, у птицы — своеобразное заболевание — пероз (perosis — скользящий сустав).

Содержание марганца в цельной крови в пределах 2—25 мкг% (приложение 6). Снижение марганца отмечают при энзоотической остеодистрофии, длительном недостаточном поступлении элемента с кормом и водой.

Источники: 57, 73.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕДИ И ЖЕЛЕЗА В КРОВИ ПО СЕНДЕЛУ В МОДИФИКАЦИИ С. Г. КУЗНЕЦОВА

Принцип. Медь с дифинилкарбазопом, а железо с о-фенантролином при известном pH образуют соединения, придающие растворам определенную окраску, степень которой измеряют на фотоэлектроколориметре.

Реактивы. 1. 0,5 н. (0,5 моль/л) раствор соляной кислоты.

2. 2 н. (2 моль/л) раствор соляной кислоты.

3. 10%-ный раствор аммиака.

4. 0,1%-ный водный раствор п-нитрофенола.

5. 1%-ный раствор аскорбиновой кислоты.

6. 1%-ный раствор солянокислого о-фенантролина. Растворы 5 и 6. Хранят в холодильнике в темных склянках.

7. 0,1%-ный спиртовой раствор фенолфталеина.

8. 0,1 моль/л ацетатный буфер, pH 4. В мерной колбе на 1 л растворяют 13,608 г уксуснокислого натрия ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$, х. ч.), приливают 25 мл ледяной уксусной кислоты (х. ч.) и доводят объем дистиллированной водой до метки. Далее буфер фильтруют и определяют pH. Хранят при 4°С.

9. 0,01%-ный раствор дифинилкарбазона в бензоле. 10 мг реактива переносят в мерную колбу на 100 мл, добавляют 40—50 мл бензола (х. ч.) и нагревают в стакане с горячей водой до растворения реактива. Колбу охлаждают и доводят объем бензолом до метки. Раствор хранят в темной склянке 2 нед.

10. Основной стандартный раствор железа (100 мкг/мл): 0,8634 г железоаммонийных квасцов ($NH_4Fe(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$, х. ч.) растворяют в 1 л бидистиллированной воды, подкисленной 5 мл концентрированной серной кислоты. Для построения калибровочной кривой готовят рабочие растворы, содержащие в 1 мл от 1 до 5 мкг железа. Пробы должны содержать от 0,5 до 20 мкг железа.

11. Основной стандартный раствор меди (100 мкг/мл): 0,3928 г свежеперекристаллизованной сернокислой меди ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) растворяют в 1 л бидистиллированной воды, подкисляют 5 мл концентрированной серной кислоты. Для построения калибровочной кривой готовят рабочий раствор, содержащий 2 мкг меди в 1 мл (2 мл основного раствора в 100 мл). Берут 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1; 1,5 мл рабочего раствора, доводят до 5 мл дистиллированной водой, добавляют по 0,5 мл 0,5 н. соляной кислоты, 1 каплю фенолфталеина и далее по методике определения меди, описанной выше. Пробы содержат соответственно 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 2; 3 мкг. При необходимости следует приготовить серию рабочих растворов, содержащих от 0,5 до 5 мкг меди (мл).

Оборудование. Фотоэлектроколориметр; тигли фарфоровые; муфельная печь; электроплитка; пробирки с притертыми пробками.

Ход определения. В фарфоровый тигель вносят 2 мл крови, сжигают в муфельной печи при температуре 550—600°С в течение 5—7 ч. Если озоление полностью не произошло, то тигель охлаждают, добавляют 1 мл 50%-ного раствора азотной кислоты, осторожно выпаривают на электроплитке и снова помещают в муфельную печь на 1—2 ч. В тигель приливают 5—6 мл 2 н. раствора соляной кислоты, доводят до кипения, а затем переносят в пробирку на 10 мл. Тигель

споласкивают бидистиллированной водой, сливают содержимое в пробирку и объем доводят до метки.

1. Определение меди. 5 мл раствора золы вносят в пробирку с притертой пробкой, прибавляют 1 каплю 0,1%-ного раствора фенолфталеина, по каплям 10%-ный раствор аммиака до появления светло-розовой окраски. В случае перетитрования вносят по каплям 2 н. раствор соляной кислоты до получения нужной окраски. Для точного установления pH прибавляют 1 мл ацетатного буфера. Розовая окраска исчезает. Затем в пробирку вносят 0,01%-ного раствора дефинилкарбазона (5 мл из бюретки на 50 мл) и встряхивают 1 мин. После расслоения верхний слой приобретает красную окраску, интенсивность которой пропорциональна количеству меди в пробе. Оптическую плотность верхнего слоя измеряют на ФЭКе при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 1 см против контроля. Окраска устойчива в течение суток.

2. Определение железа. 2,5 мл раствора золы вносят в пробирку с меткой на 5 мл, добавляют 1 каплю 0,1%-ного раствора п-нитрофенола и нейтрализуют 10%-ным раствором аммиака до появления желтой окраски. По каплям прибавляют 0,5 н. раствор соляной кислоты до исчезновения окраски, а затем 5 капель 1%-ного раствора аскорбиновой кислоты, перемешивают и через 10 мин еще 5 капель 1%-ного раствора солянокислого о-фенантролина. Доводят бидистиллированной водой до метки, перемешивают. Измеряют на ФЭКе при длине волны 510 нм в кювете с толщиной слоя 1 см против контроля. Окраска устойчива в течение суток.

Расчет ведут по формуле:

$$X = \frac{aV \cdot 100}{вс},$$

где X — количество меди или железа, мкг%; a — количество меди или железа по калибровочной кривой, мкг; c — количество раствора, взятого на анализ, мл; V — объем раствора золы, мл (для меди он равен 10 мл, для железа — 5 мл); 100 — коэффициент для пересчета в мкг%.

Клиническое значение. Железо входит в состав гемоглобина. Примерно 65% общего количества железа находится в циркулирующей крови. В эритроцитах его концентрация составляет 100—105 мг%, в цельной крови — от 30 до 58 мг% (приложение 6), в сыворотке крови — 0,11—0,20 мг%. Железо в составе гемоглобина и миоглобина выполняет в организме окислительные функции, оно входит в состав простетической группы ксантиноксидазы, сукцинатдегидрогеназы, коферментов дегидрогеназы муравьиной кислоты и ацетил-КоА. При недостатке железа развивается гипохромная микроцитарная анемия, сопровождаемая снижением в крови гемоглобина и железа.

Медь принимает непосредственное участие в гемопоэзе, катализирует включение железа в структуру гемма, способствует созреванию эритроцитов, является остеогенным элементом, входит в состав медьсодержащего белка — церулоплазмина. Она является составной частью цитохромоксидазы, тирозиназы, уреазы и многих других ферментов. При ее недостатке развивается анемия, нарушается пигментация и кератинизация шерсти и пера, наступает дистрофия костей, снижаются продуктивность и репродуктивная функция. Такие явления сопровождаются снижением меди в крови (норма, см. приложение 6).

Избыточное поступление меди ведет к накоплению ее в печени и почках, развивается токсикоз. В этих случаях можно обнаружить повышение концентрации меди в крови.

Источники: 30, 73.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ МОДИФИЦИРОВАННЫМ МЕТОДОМ РЕВИНА

Принцип метода основан на окислении р-фенилендиамина при участии церулоплазмина. Ферментативная реакция останавливается при добавлении фтористого натрия. По оптической плотности окрашенного раствора судят о концентрации цирулоплазмина.

Реактивы. 1. 0,5%-ный водный раствор солянокислого р-фенилендиамина. Готовят из продажного препарата, который хранят в холодильнике в склянке из темного стекла.

2. 0,4 моль/л ацетатный буфер, pH 5,5. Готовят из двух исходных растворов(«а», «б»). Раствор «а»: 54,44 г ацетата натрия растворяют (натрий уксуснокислый, 3-водный) в 1 л дистиллированной воды. Раствор «б»: 22,6 мл ледяной уксусной кислоты доводят дистиллированной водой до 1 л. Полученные растворы смешивают в соотношении 9 : 1. Буфер обычно готовят в объеме 1 л, хранят в холодильнике.

3. 3%-ный раствор фтористого натрия. Продажный препарат растворяют в дистиллированной воде, осадок отфильтровывают. Готовят в небольшом количестве.

Оборудование. Фотоэлектроколориметр; водяная баня.

Ход определения. В обычные химические пробирки вносят по 0,1 мл сыворотки (без следов гемолиза). В одну из них (контроль) вливают 2 мл раствора фтористого натрия для инактивации церулоплазмина. Затем во все пробирки добавляют по 8 мл ацетатного буфера и по 1 мл раствора р-фенилендиамина. Пробирки встряхивают и помещают на 1 ч в водяную баню при +37°С. После инкубации во все пробирки, кроме контрольной, вносят по 2 мл раствора фтористого натрия. Содержимое пробирок перемешивают и переносят в холодильник, где выдерживают 30 мин при 4°С. Пробы колориметрируют на ФЭКе при длине волны 530 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 1 см против контроля. Контроль имеет бледно-розовую окраску. Расчет ведут по формуле: $X = a \cdot 87{,}5$, где X — количество церулоплазмина в сыворотке, мг%; a — оптическая плотность образца; 87,5 — коэффициент пересчета в мг%.

Клиническое значение. Определение церулоплазмина в сыворотке крови проводят для оценки обеспеченности организма медью, состояния печени, гемопоэза и т. д. Известно, что около 90% меди входит в состав церулоплазмина. Повышенное содержание церулоплазмина наблюдают при гепатите, циррозе печени, механической (но не паренхиматогенной) желтухе, лейкозах, пневмонии, многих инфекционных заболеваниях, протекающих с лихорадкой и распадом клеточных элементов.

Источник. 47.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИНКА В КРОВИ С ДИТИЗОНОМ ПО Н. А. ЧЕБОТАРЕВОЙ

Принцип. Цинк с дитизоном образует комплексное окрашивающееся соединение; интенсивность окраски зависит от концентрации элемента.

Реактивы. 1. Основной раствор дитизона (х. ч.). В делительную воронку на 250 мл вносят 0,02 г дитизона и 100 мл четыреххлористого углерода. Энергично встряхивают в течение 15 мин. Приливают 100 мл бидистиллированной воды, в которую предварительно вносят 0,5 мл 25%-ного раствора аммиака, встряхивают 2—3 мин. Удаляют слой четыреххлористого углерода. Оставшийся оранжевый раствор дитизона 2 раза промывают 10 мл четыреххлористого углерода. По окончании промывки прибавляют 2,5 мл разведенной серной кислоты (1 : 5) — появляются черные хлопья, перемешивают, добавляют 100 мл четыреххлористого углерода и встряхивают 1 мин. После разделения фаз раствор дитизона в четыреххлористом углероде сливают в чистую делительную воронку, добавляют 50 мл бидистиллированной воды и встряхивают 1 мин для удаления серной кислоты. Промывку водой повторяют еще 2 раза. Раствор дитизона переливают в сухую склянку из темного стекла с притертой пробкой. Хранят в холодильнике до 1 мес. Качество реактива проверяют так: в делительную воронку вносят 5 мл раствора дитизона и 25 мл 0,01 н. раствора аммика (0,7 мл 25%-ного раствора аммиака на 1 л воды), встряхивают 2—3 мин. Органический слой должен быть бесцветным. Если он окрашен в бурый цвет, то раствор дитизона для анализа непригоден.

2. Рабочий раствор дитизона готовят перед анализом. В сухую мерную колбу на 100 мл вносят 6 мл основного раствора дитизона и доводят до метки четыреххлористым углеродом. Хорошо перемешивают.

3. Ацетатный буферный раствор с pH 5. 272 г натрия уксуснокислого, 3-водного (х. ч.) вливают в мерную колбу на 1 л, растворяют в небольшом количестве бидистиллированной воды, прибавляют 58 мл ледяной уксусной кислоты и доводят бидистиллированной водой до метки. К полученному раствору прибавляют 25 мл 50%-ного раствора тиосульфата натрия (натрий серноватистокислый, 5-водный, гипосульфит).

4. 20%-ный раствор соляной кислоты, х. ч.

5. 0,3 н. (0,3 моль/л) раствор соляной кислоты.

6. Стандартный раствор цинка основной. В мерную колбу на 1 л вносят 100 мг металлического цинка, добавляют небольшое количество бидистиллированной воды и 10 мл 20%-ной соляной кислоты. После полного растворения цинка доводят бидистиллированной водой до метки. В 1 мл содержится 100 мкг цинка. При отсутствии металлического цинка можно использовать сернокислый цинк. С этой целью 0,4396 г реактива ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, х. ч.) растворяют в 1 л бидистиллированной воды, предварительно подкисляют 5 мл серной кислоты. 1 мл основного раствора содержит 100 мкг цинка.

7. Рабочий стандартный раствор цинка готовят в день проведения анализа. В мерную колбу на 100 мл вносят 1 мл основного стандартного раствора и доводят до метки 0,3 н. соляной кислотой. В 1 мл содержится 1 мкг цинка.

8. Очистка четыреххлористого углерода. К 500 мл реактива добавляют 10 г активированного угля, встряхивают 5 мин и пропускают через складчатый бумажный фильтр. Очистку повторяют 2—3 раза с новой порцией угля. После этого четыреххлористый углерод перегоняют в стеклянном аппарате на шлифах. Четыреххлористый углерод марки «х.ч.» и «о.с.ч.» можно использовать без очистки.

9. 50%-ный раствор тиосульфата натрия, х. ч. 50 г вещества растворяют в 50 мл бидистиллированной воды.

10. Серная кислота, х. ч., разведенная 1 : 5.

11. 25%-ный раствор водного аммиака.

12. Активированный уголь.

Оборудование. Фотоэлектроколориметр; муфельная печь; электроплитка; перегонный аппарат стеклянный; тигли фарфоровые; делительные воронки на 250 и 500 мл; бюретки на 50 мл.

Ход определения. 5 мл цельной крови в фарфоровом тигле обугливают на электроплитке, постоянно повышая температуру до 200—250°С. Затем пробы ставят в муфельную печь и сжигают при температуре 500—550°С в течение 3—4 ч. Если материал полностью не сгорел, в тигель приливают 1—2 мл 50%-ной азотной кислоты, выдерживают на электроплитке, не допуская разбрызгивания раствора, и ставят в муфель на 1 ч при температуре 500°С. При необходимости эту операцию повторяют. Тигель охлаждают. Золу смачивают 5 мл 20%-ного раствора соляной кислоты и осторожно упаривают на электроплитке досуха, не допуская разбрызгивания массы и прокаливания остатка.

В тигель приливают 2,5 мл 20%-ного раствора соляной кислоты, 5 мл бидистиллированной воды и нагревают на плитке до растворения золы. Смесь охлаждают, переносят в пробирки с меткой на 25 мл (желательно с притертой пробкой) или в мерные колбы на 25 мл, смывая остатки из тигля бидистиллированной водой; доводят объем до метки и перемешивают.

В делительную воронку (или пробирку с притертой пробкой) объемом 40—50 мл вносят 5 мл раствора золы, прибавляют 10 мл ацетатного буфера и перемешивают. Приливают из бюретки 10 мл рабочего раствора дитизона, встряхивают воронку в течение 1 мин. После разделения фаз органический слой сливают в кювету с толщиной слоя 1 см и фотометрируют на ФЭКе при длине волны 538 нм (зеленый светофильтр) против контроля. При использовании пробирок верхний водный слой отсасывают при помощи водоструйного насоса или отбирают сразу нижний слой пипеткой с грушей. При хорошем качестве реактивов цвет не должен изменяться в течение суток.

Содержание цинка в образце находят по калибровочной кривой. Для построения ее в делительные воронки (или пробирки с притертыми пробками) вносят 1, 2, 3, 4, 5 мл рабочего стандартного раствора цинка. Объем доводят до 5 мл 0,3 н. соляной кислотой. Далее поступают, как и с образцами.

Расчет проводят по формуле:

$$\text{Цинк, мкг \%} = \frac{aV \cdot 100}{bc},$$

где a — количество мкг цинка по калибровочной кривой; b — количество крови, мл; c — количество раствора золы, взятого для анализа, мл; V — объем раствора золы, мл; 100 — коэффициент пересчета в мкг%.

Клиническое значение. Влияние цинка на организмы проявляется действием многочисленных ферментов (карбоксипептидазы, карбоангидразы, щелочной фосфатазы, малатдегидрогеназы, аргиназы, уриказы и др.), для которых он является необходимым компонентом или активатором. При недостатке цинка задерживаются рост, развитие, костеобразование, у поросят появляется заболевание паракератоз, у самцов снижается спермообразование. В крови снижается уровень цинка до предельной нормы (приложение 6).

Источники: 73, 130.

ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СЕЛЕНА В ПОЧВАХ, КОРМАХ, КРОВИ И ДРУГИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛАХ С 2,3-ДИАМИНОНАФТАЛИНОМ (ДАН)

Принцип. Определение селена с 2,3-диаминонафталином основано на способности этого реактива избирательно образовывать комплексное соединение с четырехвалентным селеном, находящимся в форме селен-иона SeO_3^{-2}. Разложение образца проводится смесью азотной и хлорной кислот, а перевод шестивалентного селена в четырехвалентный — нагреванием раствора с концентрированной соляной кислотой.

Четырехвалентный селен взаимодействует с 2,3-диаминонафталином, при этом образуется комплексное соединение 4,5-бензопиазоселенол, которое флуоресцирует под действием ультрафиолетовых лучей. Соединение экстрагируется из кислых растворов органическими растворителями — циклогексаном, н-гексаном, декалином, толуолом. Максимум светопоглощения 4,5-бензопиазоселенола в циклогексане находится при 378 нм, максимум флуоресценции — при 520 нм. Интенсивность флуоресценции определяют на флуориметре. Чувствительность метода 0,01 мкг/г.

Реактивы. 1. Азотная кислота концентрированная, х.ч.

2. Соляная кислота, х. ч.

3. 0,1 н. (0,1 моль/л) раствор соляной кислоты из стандарт-титра.

4. Аммиак, водный раствор 1 : 10.

5. Хлорная кислота (х. ч.), 57%-ный раствор.

6. Комплексон III (динатриевая соль этилендиаминтетроуксусной кислоты, трилон Б), 2%-ный раствор.

7. Персульфат аммония $(NH_4)_2S_2O_3$, х. ч.

8. Селен металлический, х. ч.

9. н-гексан или циклогексан, перегнанные.

10. 0,1%-ный водный раствор 2,3-диаминонафталина. 0,1 г реактива заливают 100 мл 0,1 н. соляной кислоты, перемешивают до растворения навески и очищают экстракцией гексаном. Для этого солянокислый раствор 2,3-ДАН вносят в делительную воронку, добавляют 15 мл гексана и встряхивают 1 мин. После разделения фаз солянокислый раствор 2,3-ДАН переливают в другую делительную воронку, а органическую фазу выбрасывают. К раствору 2,3-ДАН добавляют еще 10 мл гексана и очистку повторяют. Очищенный солянокислый раствор 2,3-ДАН фильтруют и используют для анализа. Хранят в склянке из темного стекла не более 3—4 дней.

11. Стандартные растворы селена, содержащие 100; 10; 0,1 мкг/мл. Раствор А. 0,100 г металлического селена растворяют в 10 мл концентрированной азотной кислоты сначала на холоду при помешивании, затем при нагревании. Смесь упаривают на водяной бане до влажной массы. Полученную селенистую кислоту (H_2SeO_3) растворяют в воде, переносят в мерную колбу емкостью 1 л, прибавляют 10 мл концентрированной соляной кислоты и доводят

метки дистиллированной водой. Раствор А содержит 100 мкг селена в 1 мл.

Более слабые растворы селена в 1 мл содержат 10 мкг (раствор Б) и 0,1 мкг (раствор В). Готовят их последовательным разбавлением водой раствора А. Стандартный раствор В готовят перед использованием.

12. Набор индикаторной универсальной бумаги.

13. Фильтры бумажные обеззоленные (белая лента).

Оборудование. Флуориметр ЭФ-3МА с ртутно-кварцевой лампой, набором кювет и светофильтров; электроплитка мощностью 800 Вт с несколькими степенями накаливания; водяная баня; делительные воронки на 100 и 250 мл; стаканы термостойкие на 50 и 100 мл.

Ход определения. Для анализа берут 1 г почвы, 50—500 мг кормов, 1 г зольных, 1 мл цельной крови, 10 мл молока. Измельченный образец (почва, корма) или необходимый объем крови (молока) помещают в стаканчик на 50 или 100 мл, добавляют 5 мл концентрированной HNO_3 и 0,1 г персульфата аммония, стакан закрывают часовым стеклом и осторожно нагревают на электроплитке. После упаривания воды и частичного разложения материала добавляют 5 мл концентрированной азотной кислоты и 3 мл концентрированной хлорной кислоты и нагревают до появления белых паров хлорной кислоты. Если раствор при этом остался темным или желтым, то продолжают сильное нагревание его, добавляя в дымящую хлорную кислоту осторожно по каплям концентрированную азотную кислоту до полного обесцвечивания раствора. После этого стакан снимают с плитки, охлаждают, смывают стенки стакана 2—3 мл воды и снова нагревают стакан на плитке до появления паров хлорной кислоты. Нельзя при этом выпаривать раствор досуха. На дне стакана должен оставаться остаток хлористой кислоты в количестве 0,5 мл.

Чтобы восстановить шестивалентный селен до четырехвалентного, к остатку после разложения добавляют 1 мл концентрированной соляной кислоты и нагревают раствор 10 мин на кипящей водяной бане. Затем раствор разбавляют водой до 20 мл.

Устанавливают pH 1 по универсальной индикаторной бумаге, вводя соответственно соляную кислоту или аммиак. Добавляют 2 мл 2%-ного раствора комплексона III, 2 мл раствора 2,3-ДАН и нагревают 5 мин на водяной бане. После 10—20-минутного охлаждения раствор переносят в делительную воронку, вливают 10 мл перегнанного н-гексана и экстрагируют 1 мин. По разделении фаз нижний слой (водный) отбрасывают, а экстракт сливают в пробирку и используют для флуориметрического определения селена. В серии образцов измеряют флуоресценцию органических растворов на флуориметре ЭФ-3МА со светофильтрами ФК-1 (первичный) и B_2-2 (вторичный). Количество селена в пробе, выраженное в мкг, определяют по калибровочному графику.

Для построения калибровочного графика из стандартных растворов Б и В готовят разведения с содержанием 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2 мкг Se/мл. Затем в стаканчики на 50 мл вносят по 1 мл раствора селена, доводят объем до 20 мл 0,1 н. раствором соляной кислоты, устанавливают pH 1 и далее ведут анализ, как описано выше.

В каждой серии готовят холостую пробу, учитывают ее значение при расчете содержания селена:

$$\text{Se мкг/г} = \frac{C \text{ мкг Se}}{P},$$

где C — содержание селена в образце; P — масса навески.

Содержание селена в % определяют путем умножения найденного количества селена в мкг/г на 0,0001. Например, если в образце селена 0,25 мкг/г, то в процентном отношении это будет $0{,}25 \cdot 0{,}0001 = 0{,}000025\%$, или $2{,}5 \cdot 10^{-5}\%$.

Клиническое значение. Селен участвует во многих окислительно-восстановительных процессах, обладает антиоксидантным действием в составе активного центра глутатионпероксидазы. Этот фермент разрушает токсические перекиси в тканях, благодаря чему предотвращаются жировая дистрофия печени, беломышечная болезнь и др. Содержание селена в кормах (по данным разных авторов) колеблется от 0,01 до 20 мг/кг сухого вещества, в цельной крови — от 5 до 18 мкг/кг%, в плазме — от 0,036 до 0,068 мкг%, в печени —

от 0,3 до 1,2 ч/млн, в волосах — от 0,5 до 0,7 ч/млн. Считают, что при наличии в кормах селена менее 0,01 мг/кг развивается беломышечная болезнь, возникают дистрофия печени и задержание последа, снижается продуктивность, замедляются рост и развитие. О недостатке в организме селена свидетельствуют низкие показатели этого элемента в крови, молоке, волосах, тканях печени и в мышцах.

Источник: 80.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ВИТАМИНОВ

Для своевременного выявления гиповитаминозов, помимо исследования кормов, проверяют содержание витаминов в крови, молозиве, молоке, моче, печени и других тканях, используют косвенные показатели. При изучении обмена витаминов применяют биологические, химические, физико-химические, изотопные и другие методы. В биологических субстратах содержание витаминов чаще определяют с помощью колориметрических, спектрофотометрических, спектрофлуориметрических и газохроматографических методов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА А В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПО БЕССЕЮ В МОДИФИКАЦИИ А. А. АНИСОВОЙ

Принцип. Метод основан на щелочном гидролизе и экстракции витамина А и каротина из сыворотки крови при помощи малолетучих растворителей и последующем спектрофотометрическом измерении поглощения света раствором (при длине волны 328 нм для витамина А и 460 нм для каротина) до и после разрушения витамина А ультрафиолетовыми лучами.

Реактивы. 1. 1 н. (1 моль/л) раствор едкого калия в 96%-ном этиловом спирте (1 объем 11 н. раствора КОН+10 объемов 96%-ного этилового спирта). Реактив готовят перед использованием.

2. Ксилол-октановая смесь (1 : 1). Реактивы химически чистые. В необходимых случаях ксилол перегоняют. Готовят за несколько часов до начала анализа.

3. 11 н. (11 моль/л) раствор едкого калия. 117,2 г едкого калия доводят дистиллированной водой в мерной колбе на 1 л до метки.

Оборудование. Спектрофотометр (СФ-4, СФ-4а, СФ-16 и др.), ртутно-кварцевая лампа ПРК-4; вентилятор настольный; водяная баня; пробирки из стекла пирекс, пропускающего ультрафиолетовые лучи, с притертыми пробками (55×8 мм); пипетки с резиновыми баллончиками или со шприцем для отсасывания жидкости.

Ход определения. В центрифужные пробирки вносят по 3 мл сыворотки (плазмы крови), 3 мл 1 н. спиртового раствора КОН. Содержимое пробирок перемешивают тонкой стеклянной палочкой до образования однородной смеси и ставят для гидролиза в водяную баню на 20 мин при 60°С. Затем пробирки охлаждают в воде со льдом 10 мин, добавляют в каждую по 3 мл ксилол-октановой смеси, закрывают пробками и сильно встряхивают. Затем пробирки вновь охлаждают 10 мин и центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин. Верхний слой, состоящий из ксилол-октановой смеси и содержащий витамин А и каротиноиды, отсасывают пипеткой со шприцем и вносят в кварцевую кювету с толщиной слоя 10 мм. В контрольную кювету вносят ксилол-октановую смесь и приступают к измерению экстинкции. Каротин определяют при длине волны 460 нм, а витамин А — до и после облучения проб ультрафиолетовыми лучами — при длине волны 328 нм. Для этого пробы переносят пипеткой из кюветы в пробирки из стекла пирекс, закрывают пробками и облучают лампой ПРК-4 на расстоянии 30 см в течение 1 ч. Для охлаждения пробирок применяют настольный вентилятор. По разности отсчетов при измерении экстинкции до и после облучения определяют концентрацию витамина А в сыворотке крови. Расчет ведут по формулам: I. каротин, мкг% $= E_{460} \cdot 480$, где E_{460} — экстинкция раствора при длине волны 460 нм; 480 — коэффициент для каротина. II. Витамин А, мкг% = (E_{328} до облучения — E_{328} после облучения) $\cdot 637$, где E_{328} — эк-

стинкция раствора при длине волны 328 нм; E_{637} — коэффициент для витамина А.

Клиническое значение. Основными формами витамина А являются витамин А-спирт (ретинол) и его производные в форме сложного эфира (ретинол-пальмитат) с пальмитиновой кислотой. Главный источник витамина А в организме животных — каротин. Окислительное расщепление углеродной цепи каротина происходит двумя путями: по центральной двойной связи и по периферическим связям.

При расщеплении каротина по центральной связи образуется две молекулы ретиноля, который затем восстанавливается в ретинол. Ретинол энзиматически этерифицируется в ретинол-пальмитат, откладывающийся в печени. При расщеплении каротина по периферическим двойным связям образуются апокаротиноли, которые превращаются в апокаротиноевые кислоты. Эти вещества не накапливаются в организме, но обладают биологической активностью витамина А в функции роста. Усвоение каротина и витамина А происходит в кишечнике. При этом принято считать, что усваивается только $^1/_3$—$^1/_4$ часть каротина и около $^1/_7$ части его превращается в витамин А. 25—50% витамина А переходит в печень.

При полноценном белковом питании, хорошей обеспеченности организма витамином B_{12}, а также использовании антиоксидантов повышается активность каротиндиоксигеназы, увеличивается количество молекул каротина, расщепляющихся по центру, возрастает в 1,5—2 раза эффективность синтеза витамина А.

Витамин А в организме влияет на обеспечение нормального роста и развития животных, дифференцировку эпителиальной и костной тканей, регулирует обмен веществ.

Содержание витамина А в крови, молоке и молозиве у взрослого крупного рогатого скота см. приложение 6, 12. В печени его количество составляет 30—250 мкг/г, в желтке куриного яйца — 6—75 мкг/г. У новорожденных витамина А в печени очень мало (0,5—5 мкг/г), поэтому для этих животных основные источники его — молозиво и молоко.

Снижение витамина А в крови, печени, молозиве и молоке отмечают при недостатке каротина и витамина А в кормах, плохом усвоении их вследствие хронических заболеваний органов пищеварения и печени. Если в крови у взрослых животных витамина А меньше 10 мкг%, а в печени ниже 50 мкг/г, отмечают симптомы гиповитаминоза, задерживается спермиогенез, спермии становятся малоподвижными и теряют оплодотворяющую способность, нарушаются строение и функция эпителия органов дыхания, пищеварения, репродуктивная способность самок, появляются респираторные болезни и др.

Источники: 16, 132.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАРОТИНА В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ ПО КАРР — ПРАЙСУ В МОДИФИКАЦИИ ЮДКИНА

Принцип. Каротин из белков сыворотки (плазмы) крови извлекают петролейным эфиром или авиационным бензином. Экстинкцию экстракта каротина измеряют на фотоэлектроколориметре.

Реактивы. 1. Петролейный эфир (ч.) или авиационный бензин марки Б-70.

2. 96%-ный этиловый спирт.

3. Основной стандартный раствор. 360 мг двухромовокислого калия растворяют в мерной колбе на 500 мл небольшим количеством дистиллированной воды и доводят до метки.

4. Рабочий стандартный раствор готовят перед анализом. Смешивают 2,4 мл основного стандартного раствора и 2,6 мл дистиллированной воды. Данный раствор по интенсивности окраски соответствует 1 мг% концентрации каротина.

Оборудование. Фотоэлектроколориметр; центрифуга; центрифужные пробирки; стеклянные палочки; пробирка с делением на 5 мл.

Ход определения. В центрифужную пробирку вносят 1 мл сыворотки (плазмы) крови, 3 мл 96%-ного этилового спирта, перемешивают стеклянной палочкой и центрифугируют 10 мин при 2000—3000 об/мин. Верхний слой (этиловый спирт) сливают, к осадку добавляют 5 мл эфира, тщательно перемешивают

стеклянной палочкой 2 мин. Снова центрифугируют 10 мин при 2000—3000 об/мин. Эфир с экстракцией каротина сливают в градуированную пробирку, доводят объем эфиром до 5 мл и тотчас же колориметрируют при синем светофильтре (длина волны 400—500 нм) в кювете с толщиной слоя 1 см против воды. Параллельно колориметрируют рабочий стандартный раствор двухромовокислого калия, соответствующий по окраске 1 мг% каротина. Расчет ведут по формуле:

$$X = \frac{E_{пр}}{E_{ст}} \cdot 1,$$

где X — количество каротина, мг%; $E_{пр}$ — экстинкция испытуемого образца; $E_{ст}$ — экстинкция стандартного рабочего раствора; 1 — коэффициент для пересчета в мг%.

Примечание. Уровень каротина в сыворотке (плазме) крови при хранении снижается, что следует учитывать при проведении анализов.

Клиническое значение. Каротин является основным источником витамина А. Для клинических целей каротин определяют в сыворотке (плазме) крови крупного рогатого скота с 3-месячного возраста, так как у телят молочного периода его в сыворотке крови очень мало. У свиней, лошадей, овец и коз каротин в пищеварительном тракте всасывается только в трансформированной форме витамина А, то есть каротин через стенку кишечника не проникает, поэтому в крови, печени и молоке этих животных каротин не обнаруживают или находят следовые концентрации.

Концентрация каротина в крови имеет значительное сезонное колебание: в пастбищный период повышается, в стойловый снижается (приложение 6). Снижается каротин при дефиците его в корме, плохом усвоении вследствие болезней желудочно-кишечного тракта, гепатитах и гепатозах, недостатке в рационах белка и легкоусвояемых углеводов, витамина B_{12}, разрушении каротиноидов вследствие порчи кормов, при различных токсикозах, включая нитратные.

Источники: 52, 73.

ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩЕГО ТИАМИНА В КРОВИ И ПЕЧЕНИ (ПО Г. Д. ЕЛИСЕЕВОЙ)

Принцип. Метод основан на окислении тиамина в тиохром, экстракции последнего в органический растворитель и измерении интенсивности флуоресценции.

Реактивы. 1. Стандартный раствор тиамина — 100 мг тиамин-хлорида растворяют в 100 мл 0,01 н. соляной кислоты. Хранят в холодильнике до 1 мес. Рабочий раствор готовят в день определения разведением стандартного раствора в 1000 раз. Получают раствор с содержанием тиамина 1 мкг/мл.

2. Свежеприготовленный 2%-ный раствор $[K_3Fe(CN)_6]$ — калий железосинеродистый (красная кровяная соль).

3. 30%-ный раствор едкого натра.

4. Этиловый спирт 96%-ный.

5. 0,25 н. (0,25 моль/л) раствор соляной кислоты.

6. Изобутиловый (или изоамиловый) спирт, насыщенный водой.

7. 20%-ный раствор натрия углекислого (Na_2CO_3).

8. 20%-ный раствор трихлоруксусной кислоты.

9. Фосфатаза щелочная лиофильная.

10. Универсальный индикатор или 0,04%-ный спиртовой раствор бромкрезолового пурпурного.

Оборудование. Флуориметр типа ЭФ-3; термостат; водяная баня; ступки фарфоровые; стаканчики сахарные (Хагедорна); цилиндры на 100 мл с притертыми пробками; делительные воронки, пипетки; пробирки центрифужные без делений и с делениями.

Ход определения. В стаканчик Хагедорна или большую пробирку вносят 1 мл оксалатной крови (2—3 мг оксалата на 1 мл крови), 10 мл 0,25 н. рас-

твора соляной кислоты и нагревают в кипящей водяной бане 15 мин для частичного разрушения флуоресцирующих примесей. К теплому раствору при взбалтывании прибавляют по каплям 20%-ный раствор натрия углекислого до получения pH 5,2 (по универсальному индикатору или по 0,04%-ному раствору бромкрезоловсго пурпурного), а потом 2—3 капли хлороформа и 50 мг фосфатазы. Все перемешивают стеклянной палочкой. Стаканчик закрывают ватной пробкой и выдерживают в термостате 24 ч при 37° для ферментативного расщепления кокарбоксилазы. По истечении этого времени смесь нагревают 3 мин на кипящей водяной бане. Затем через фильтр, предварительно отмытый от флуоресцирующих веществ горячей бидистиллированной водой, раствор фильтруют в чистый стаканчик Хагедорна. Остающийся при этом на фильтре осадок промывают добавлением 3 мл горячей бидистиллированной воды, чтобы избежать потери тиамина. После нагревания смесь можно отцентрифугировать при 3000 об/мин 10—15 мин. К полученному желтоватому раствору прибавляют 2 мл 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты для осаждения остальной части белков. Смесь нагревают на водяной бане при 40—50° 10 мин, после чего снова фильтруют (используют другой отмытый фильтр) в делительную воронку. Остаток на фильтре также промывают 3 мл горячей бидистиллированной воды. К фильтрату добавляют двойной объем изобутилового спирта. Смесь энергично встряхивают 2 мин для извлечения примесей и оставляют до разделения слоев (примерно на 2 ч). Верхний слой — изобутиловый спирт с посторонними флуоресцирующими веществами отбрасывают. Нижний — водный слой разливают в чистые делительные воронки (или большие пробирки) на две равные части. Она служит опытом, другая контролем. В опытную пробу вносят смесь, состоящую из 2 мл 1%-ного раствора красной кровяной соли и 2 мл 30%-ного раствора едкого натра (смесь готовят перед применением и выдерживают 2 мин), а в контрольную пробу — только 2 мл 30%-ного раствора едкого натра. В обе делительные воронки вливают по 8 мл изобутилового спирта. Смесь встряхивают 2 мин, при этом тиохром извлекается изобутиловым спиртом. После разделения слоев (через 6—24 ч) отбрасывают теперь уже нижний, водный слой, а верхний промывают добавлением 4 мл бидистиллированной воды с последующим встряхиванием и отстаиванием. После отстаивания нижний, водный слой отбрасывают, а верхний переносят в мерную пробирку, доливают изобутиловым спиртом до 8 мл (если есть помутнение, то прибавляют еще 1 мл 96%-ного этилового спирта для просветления) и флуориметрируют.

Одновременно точно так же, как опытные пробы, обрабатывают стандартный раствор тиамина с содержанием 1 мкг/мл. Настройку флуориметра проводят по стандартному раствору тиамина путем регулирования светового потока до тех пор, пока стрелка гальванометра не покажет величину, выбранную для стандартного раствора (обычно па делении 40 или 80).

Для флуориметрии используют флуориметр, снабженный чувствительным гальванометром, специфическим светофильтром с максимумом поглощения около 390 нм и одинаковыми пробирками или кюветами из нефлуоресцирующего стекла. В каждую из взятых пробирок вносят около 8 мл испытуемых окисленных и неокисленных изобутиловых растворов (опыт и контроль), а также изобутиловые растворы окисленного и неокисленного стандартного раствора тиамина и производят определение интенсивности флуоресценции по шкале гальванометра.

Расчет количества общего тиамина проводят по формуле:

$$X = \frac{(A - Б)\,K}{H} \cdot 100 \text{ мкг } \%,$$

где X — содержание тиамина в 100 мл крови; A — показатель гальванометра для опытной пробы; $Б$ — показатель гальванометра для контрольной пробы; K — цена одного деления шкалы гальванометра при данном режиме работы, в мкг тиамина; H — количество крови, взятой в опытную пробу; 100 — перевод в проценты.

Ход определения общего тиамина в печени. Навеску печени 3 г растирают в фарфоровой ступке с кварцевым песком, приливают 15 мл 0,25 н. раствора со-

ляной кислоты, размешивают и выливают в стаканчик Хагедорна или в большую пробирку. Ступку промывают еще 5 мл 0,25 н. раствора соляной кислоты и выливают в этот же стаканчик. После этого исследование проводят так же, как и при определении общего тиамина в крови. Расчет проводят по формуле:

$$X = \frac{(A - Б)K}{H} \text{ мкг/г},$$

где X — содержание тиамина, мкг/г; A — показатель гальванометра для опытной пробы; $Б$ — показатель гальванометра для контрольной пробы; K — цена одного деления шкалы гальванометра при данном режиме работы; H — навеска ткани.

Примечание. Чтобы спирты (изобутиловый, этиловый) не флуоресцировали, их очищают путем взбалтывания с активированным углем и последующим фильтрованием до полного отсутствия сине-голубого свечения на флуориметре.

Клиническое значение. Тиамин животные получают с кормом в свободном, этерифицированном и связанном виде. В кровь в основном поступает свободный тиамин, который фосфорилируется в печени.

Часть свободного тиамина поступает в общий кровоток и распределяется по другим тканям, где и фосфорилируется до тиаминдифосфата (ТДФ), являющегося коферментной формой витамина B_1. ТДФ катализирует реакции окислительного декарбоксилирования альфа-кетокислот, участвуя таким образом в процессе аэробного окисления углеводов, взаимопревращения аминокислот. Недостаток тиамина сопровождается торможением процесса распада пировиноградной кислоты и накоплением ее в крови и моче. О степени обеспеченности организма тиамином судят по его содержанию в крови, моче, печени, а также по содержанию в крови и моче пировиноградной кислоты. В крови, тканях и других биологических объектах постоянно присутствуют сам тиамин и его производные: тиаминдифосфат (ТДФ), тиаминмонофосфат (ТМФ), тиохром. Свободного тиамина в крови очень мало (0,3—0,9 мкг%), поэтому для клинических целей исследуют общий тиамин. Однако при заболеваниях почек в крови и моче определяют также и свободный тиамин.

Содержание общего тиамина в крови колеблется в пределах 7—15 мкг%, в печени — 8—13 мкг/г. При этом в плазме крови обнаруживают преимущественно свободный тиамин, в эритроцитах и лейкоцитах — фосфорилированный.

Гиповитаминоз B_1 проявляется при содержании общего тиамина в цельной крови ниже 5—6 мкг%, в печени — менее 0,3 мкг/г. Количество пировиноградной кислоты при этом превышает 0,7—1,8 мг%. Низкий уровень тиамина в крови, печени и других тканях отмечают при цереброкортикальном некрозе. Подавляется бактериальный синтез витамина B_1 в желудочно-кишечном тракте при скармливании животным антибиотиков и аминазина.

Источник: 132.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКОФЕРОЛОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ с α,α′-ДИПИРИДИЛОМ

Принцип. Метод основан на окислении токоферолов хлорным железом и определении образовавшегося Fe^{2+} в виде окрашенного комплекса с α, α′-дипиридилом, обладающего максимумом поглощения при 520 нм. Поправку на каротиноиды вносят по поглощению при 460 нм. Эфиры токоферолов гидролизуют КОН в присутствии аскорбиновой кислоты. Свободный токоферол определяют без омыления.

Реактивы. 1. Абсолютный этиловый спирт перегоняют над таблетками КОН и кристаллами $KMnO_4$ (очистка от альдегидов), выбрасывая первую и последнюю фракции (до 10% общего объема).

2. Концентрированный раствор КОН (50 г КОН в 50 мл дистиллированной воды).

3. 10%-ный раствор аскорбиновой кислоты в дистиллированной воде. Готовят непосредственно перед опытом и нейтрализуют несколькими каплями концентрированной КОН.

4. 0,3%-ный раствор α, α′-дипиридила в пропиловом спирте. Хранят в склянке из темного стекла.

5. Ксилол (х. ч.) очищенный. Продажный препарат встряхивают в делительной воронке с 3—4 порциями концентрированной H_2SO_4, пока кислотный слой не будет окрашиваться, промывают водой, насыщенным раствором перманганата калия, вновь водой до удаления окраски $KMnO_4$, сушат над безводным Na_2SO_4 и перегоняют, отбрасывая первые и последние 10% отгона.

6. 0,12%-ный раствор железа хлорного ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) в абсолютном этиловом спирте. Сохраняют в темной склянке.

7. D, L-α-токоферол, стандартный раствор в абсолютном этиловом спирте с концентрацией 100 мкг/мл.

Оборудование. Фотоэлектроколориметр или спектрофотометр; пробирки 18×1,5 см с притертыми пробками; пробирки центрифужные; центрифуга.

Ход определения свободного токоферола. К 2 мл плазмы (сыворотки) приливают 1 мл дистиллированной воды и 3 мл по каплям при перемешивании абсолютного этилового спирта. Добавляют 5 мл ксилола, закрывают пробкой, интенсивно перемешивают 6 мин и центрифугируют 5 мин при 3500 об/мин. Отбирают 3 мм ксилолового экстракта, измеряют его оптическую плотность при 460 нм (поправка на каротины) против воды, прибавляют 1 мл раствора α, α′-дипиридила в пропиловом спирте, взбалтывают, приливают 1 мл раствора $FeCl_3$, тщательно перемешивают и точно через 2 мин фотометрируют при 520 нм против воды. Одновременно таким же образом обрабатывают контроль на реактив, содержащий вместо плазмы (сыворотки) 2 мл воды. Для содержания токоферолов рассчитывают оптическую плотность токоферолов ($Д_е$) по формуле: $Д_е = Д_{520} - (Д_к + 0{,}217 \cdot Д_{460})$, где $Д_{520}$ — оптическая плотность опытной пробы при 520 нм; $Д_{460}$ — тоже при 460 нм; $Д_к$ — оптическая плотность контрольной пробы при 520 нм; 0,217 — экспериментально определенная поправка на оптическую плотность, обусловленную присутствием каротиноидов.

Концентрацию свободного токоферола рассчитывают по калибровочной кривой, для построения которой используют стандартный раствор D, L-α-токоферола при содержании последнего от 10 до 100 мкг в пробе.

Ход определения суммарного токоферола и его эфиров. В пробирках 18×1,5 см с притертыми пробками смешивают 2 мл плазмы сыворотки, 1 мл 10%-ного раствора аскорбиновой кислоты, 0,2 мл концентрированной КОН и 3 мл абсолютного спирта. Затем в них вносят шарики или осколки кварцевого стекла, накрывают небольшими воронками и помещают в кипящую водяную баню так, чтобы нижняя часть пробирки была в воде на 2 см. Верхнюю часть пробирок охлаждают током воздуха из воздуходува. Через 10 мин пробирки охлаждают холодной водой, добавляют 5 мл ксилола, интенсивно перемешивают 8 мин, центрифугируют 5 мин при 3500 об/мин и далее обрабатывают, как описано выше.

Содержание эфиров токоферола рассчитывают по разности суммарного и свободного токоферола. По данным ряда авторов, содержание свободного токоферола в плазме крови в 6—6,5 раза больше их эфиров.

Примечания. 1. Желательно работать в затемненном помещении и проводить фотометрирование через строго определенное время после добавления дипиридила, так как окраска нестабильна. 2. Сыворотку (плазму) при комнатной температуре хранить в течение суток, при 5° — 2 нед, а при —20° — 2 мес.

Источник: 132.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКОФЕРОЛОВ В ТКАНЯХ И СЫВОРОТКЕ КРОВИ МЕТОДОМ КОЛОНОЧНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Принцип метода тот же, что и для хроматографии. Наиболее удачным адсорбентом для удаления примесей является окись алюминия.

Реактивы. 1. Этиловый спирт 96%-ный.

2. Абсолютный этиловый спирт.
3. Чистый бензол (без тиофена).
4. Концентрированная серная кислота.
5. Безводный сернокислый натрий.
6. Окись алюминия для хроматографии, сильно активированная.
7. Петролейный эфир.
8. Углекислота или азот.
9. 0,2%-ный раствор $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ в абсолютном спирте.
10. 0,5%-ный раствор α, α′-дипиридила в абсолютном спирте.
11. Стандартный раствор токоферола (250 мг D, L-α-токоферола растворяют в мерной колбе ледяной уксусной кислотой до объема 250 мл).

Оборудование. Адсорбционная колонка; фотоэлектроколориметр; колбы; пипетки; пробирки; бюхтеревская воронка; делительная воронка.

Очистка окиси алюминия. 400 г окиси алюминия, используемой в качестве адсорбента, суспендируют с 200 мл концентрированной H_2SO_4, в которой до этого было растворено 20 г хлористого цинка. Добавляют 20 мл дистиллированной воды и ставят колбу в холодильнике на 72 ч. Подготовленную таким образом окись алюминия переносят в бюхтеревскую воронку, промывают обычной водой до нейтральной реакции, затем ацетоном и сушат на воздухе. Отвешивают необходимое количество приготовленного адсорбента и прокаливают его в муфельной печи 6 ч при температуре 450°С. Перед употреблением влажность окиси алюминия доводят дистиллированной водой до 9%.

Адсорбционная колонка предназначена для хроматографии, имеет вид стеклянной трубки диаметром 10 мм, заполненной адсорбентом на высоту 80 мм. Рыхлость слоя должна быть такой, чтобы он пропускал 30 капель за 1 мин. Чтобы предотвратить увлажнение адсорбента, сверху насыпают безводный сернокислый натрий. Перед началом хроматографии через колонку пропускают чистый петролейный эфир (5—6 мл).

Ход определения. 2 мл сыворотки (плазмы) вносят в сухую делительную воронку (50 мл), прибавляют 10 мл этилового спирта, смесь энергично встряхивают 3 мин, после чего дважды экстрагируют 10 мл бензола при встряхивании по 3 мин. Объединенный безбелковый экстракт со следами спирта высушивают над безводным сернокислым натрием в защищенном от света месте.

Навеску ткани (1—3 г) гомогенизируют с 20 мл спиртово-бензольной смеси (1 : 1), переносят в колбу с круглым дном, закрывают пробкой и экстрагируют 30—40 мин. После этого спиртово-бензольный экстракт фильтруют в делительную воронку и омыляют свежеприготовленным 50%-ным раствором КОН (55% к объему омыляемого вещества). Так как токоферол очень чувствителен к воздействию щелочей и легко ими разрушается, процесс омыления проводят при полном отсутствии кислорода или под защитой антиокислителей. С этой целью в делительную воронку несколько раз вводят CO_2 или высыпают 50—100 мг пирогаллола. После окончания омыления в делительную воронку добавляют 50 мл дистиллированной воды с 1 мл концентрированной серной кислоты для нейтрализации КОН. Тщательно взбалтывают смесь и отделяют бензольную фракцию. Содержимое воронки промывают дистиллированной водой до нейтральной реакции. Экстракт сушат в колбе над безводным сернокислым натрием. Высушенный бензольный экстракт фильтруют в низком тигле, споласкивая осадок чистым бензолом, и выпаривают досуха на песчаной бане при температуре 60°С.

Хроматография. Неомыленный осадок (по 5 мл каждый раз) растворяют в эфире трижды и наносят на подготовленную адсорбционную колонку. Каротиноиды вымывают петролейным эфиром. Токоферол экстрагируют 5—6 раз бензолом (по 1 мл). Элюат выпаривают в токе нейтрального газа, а сухой остаток растворяют в абсолютном спирте и доводят объем до 4,6 мл. Добавляют 0,2 мл α, α′-дипиридила. Колориметрируют при 490 нм через 2,5 мин после добавления $FeCl_3 \cdot 6H_2O$. Расчет ведут по калибровочному графику, построенному по стандартному раствору D, L-α-токоферола.

Клиническое значение. Из большой группы токоферолов (витамина Е) наибольшей биологической активностью обладает альфа-токоферол. Токоферолы участвуют в разнообразных реакциях организма. Они выполняют роль антиоксидантов, инактивирующих свободные радикалы и тем самым предот-

вращающих накопление насыщенных тканевых липидов молекулярным кислородом.

При недостатке витамина Е усиливаются процессы перекисного окисления липидов, накопление гидроперекисей и других продуктов окисления. Это сопровождается дистрофическими изменениями в печени, семенниках, мышцах и других тканях. Снижается спермиогенез, понижается активность спермиев, отмечается эмбриональная смертность, наступают миопатия, экссудативный диатез, энцефаломаляция. В норме у здоровых взрослых животных в сыворотке крови токоферолы составляют 0,6—1,4 мг%, а у новорожденных — 0,3—0,5 мг%.

Снижение содержания токоферолов в сыворотке крови взрослых животных сопровождается гиповитаминозом Е. Причины его — недостаток в кормах токоферолов, плохая их усвояемость при заболевании печени, желудка и кишечника. Уровень витамина Е в крови зависит также от степени обеспеченности организма бета-липопротеидами, ответственными за транспорт токоферолов в организме.

Источник: 132.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА С В ПЛАЗМЕ КРОВИ

Принцип. Аскорбиновая кислота (витамин С) восстанавливает трехвалентное железо в двухвалентное. Последнее образует с α, α′-дипиридилом комплексное соединение розового цвета.

Реактивы. 1. 5%-ный раствор трихлоруксусной кислоты. 5 г ТХУ растворяют в 95 мл дистиллированной воды.

2. 40%-ный раствор трихлоруксусной кислоты. 40 г ТХУ растворяют в 60 мл дистиллированной воды.

3. 3%-ный раствор хлорного железа ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$). 1,5 г хлорного железа растворяют в 50 мл дистиллированной воды. Хранят не более 3 сут.

4. 1%-ный раствор α, α′-дипиридила. В воде α, α′-дипиридил растворяется плохо, поэтому его навеску необходимо смочить 96%-ным этиловым спиртом. К 0,5 г α, α′-дипиридила приливают 4 мл спирта, а затем в мерной колбе на 50 мл доливают бидистиллированной водой до метки.

5. 85%-ная фосфорная кислота, орто.

6. Аскорбиновая кислота.

Оборудование. Фотоэлектроколориметр; центрифуга; центрифужные пробирки; колбы мерные на 50 и 100 мл.

Ход определения. К 2 мл плазмы крови добавляют 0,3 мл охлажденного 40%-ного раствора ТХУ, перемешивают стеклянной палочкой и оставляют на 10 мин на холоде (в воде со льдом) с целью более полной денатурации белков. Центрифугируют 20 мин при 2000 об/мин. К 1 мл надосадочной жидкости прибавляют 0,5 мл бидистиллированной воды, 0,1 мл 85%-ного раствора фосфорной кислоты (орто), 0,8 мл 1%-ного раствора α, α′-дипиридила и 0,1 мл 3%-ного раствора хлорного железа. Содержимое пробирки после добавления каждого реактива тщательно перемешивают и оставляют на 30 мин для проявления окраски. Окраска стабильна в течение суток.

После 30 мин пробы центрифугируют 5 мин при 2000 об/мин и колориметрируют на ФЭКе при длине волны 525 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 5 мм против контрольной пробы (вместо надосадочной жидкости берут дистиллированную воду, а затем поступают так же, как с опытной пробой).

Содержание витамина С рассчитывают с помощью калибровочного графика. 33,3 мг аскорбиновой кислоты растворяют в 100 мл 5%-ного раствора ТХУ. 10 мл этого раствора вносят в мерную колбу на 100 мл и доливают до метки 5%-ным раствором ТХУ. В 6 мерных колбочек на 100 мл вносят последовательно 4, 6, 8, 10, 20, 30 мл стандартного раствора и доводят до метки дистиллированной водой. По 1,5 мл раствора из каждой колбочки вносят в центрифужные пробирки, прибавляют по 0,1 мл 85%-ной фосфорной кислоты (орто), 0,8 мл 1%-ного раствора α, α′-дипиридила и 0,1 мл 3%-ного раствора хлорного железа, перемешивают, ставят на 30 мин для проявления окраски.

Перед колориметрированием пробы центрифугируют 5 мин при 2000 об/мин. Полученные результаты изображают графически на миллиметровой бумаге.

Примечания. 1. Стандартные растворы аскорбиновой кислоты нестойки. Их готовят непосредственно перед определением. 2. Содержание витамина С в плазме крови при ее хранении снижается. 3. Определение витамина С необходимо проводить в свежей плазме, отделенной от форменных элементов в течение 4 ч после отбора проб крови.

Клиническое значение. Аскорбиновая кислота участвует в различных обменных реакциях: гидроксилирования пролина при синтезе коллагена, превращения 3,4-диоксифенилэтиламина в норадреналин, превращения кортикостероидов и трансферина и т. д. Всасывается в желудочно-кишечном тракте, главным образом в тонком отделе кишечника. Уровень аскорбиновой кислоты в сыворотке крови животных колеблется в пределах 0,2—1,5 мг% (приложение 6). Содержание витамина С в плазме крови несколько выше, чем в сыворотке. Снижение его в сыворотке крови до 0,3—0,4 мг% и ниже сопровождается клиническими симптомами гиповитаминоза.

Источники: 73, 86.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

При диагностике различных заболеваний используют показатели активности десятков ферментов и их изоферментов. В клинической практике часто определяют активность аспартатаминотрансферазы (АсАТ), аланинаминотрансферазы (АлАТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), щелочной фосфатазы (ЩФ), глутаматдегидрогеназы (ГлДГ), аргиназы, уракиназы, гистидазы, алкогольдегидрогеназы, цитохромоксидазы, транскетолазы, амилазы, сорбитолдегидрогеназы и др.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АСПАРТАТАМИНОТРАНСФЕРАЗЫ И АЛАНИНАМИНОТРАНСФЕРАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ДИНИТРОФЕНИЛГИДРАЗИНОВЫМ МЕТОДОМ (РАЙТМАН, ФРЕНКЕЛЬ)

Принцип. В результате переаминирования, происходящего под действием АсАТ и АлАТ, образуются щавелевоуксусная и пировиноградная кислоты. Щавелевоуксусная кислота способна в процессе ферментативной реакции превращаться в пировиноградную кислоту. При добавлении 2,4-динитрофенилгидразина в щелочной среде образуется окрашенный гидрозон пировиноградной кислоты, интенсивность окраски которого пропорциональна количеству образовавшейся пировиноградной кислоты.

Реактивы. 1. 0,1 моль/л фосфатный буфер, pH 7,4. 17,4 г двузамещенного фосфорнокислого натрия ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) и 13,6 г однозамещенного фосфорнокислого калия (KH_2PO_4) доводят каждый в отдельности до 1 л дистиллированной водой. Предварительно соль растирают в ступке в порошок. Двузамещенный фосфорнокислый натрий, содержащий две молекулы воды, получают путем двухсуточного выветривания на воздухе кристаллической соли (х. ч.), содержащей обычно 12 молекул воды. Для получения буферного раствора смешивают 840 мл 0,1 моль/л раствора $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ и 160 мл 0,1 моль/л раствора KH_2PO_4. Полученный раствор с индикатором бромтимоловым синим должен давать голубую окраску. К приготовленному раствору в качестве консерванта можно добавить 5—10 мл хлороформа.

2. 0,04%-ный раствор бромтимолового синего. 100 мг индикатора растирают в ступке с 3,2 мл 0,05 н. (0,05 моль/л) раствора едкого натра. После растворения смывают водой в мерную колбу емкостью 250 мл и доводят водой до метки.

3. Субстратный раствор для определения аспартатаминотрансферазы. 29,2 мг альфа-кетоглутаровой кислоты и 2,66 г DL-аспарагиновой кислоты (или 1,33 г L-аспарагиновой кислоты) отвешивают на аналитических весах и растворяют в 1 н. растворе едкого натра. Последний следует прибавить осторожно, небольшими порциями до полного растворения составных частей и до получения pH 7,4. Раствор приливают количественно в мерную колбу емкостью 100 мл, ополаскивая 0,1 моль/л фосфатным буфером pH 7,4. Доливают буфер в колбу до метки, тщательно перемешивают, прибавляют 1 каплю хлороформа и ес-

хранят в холодильнике в замороженном виде. Перед употреблением раствор полностью оттаивают.

4. Субстратный раствор для определения аланинаминотрансферазы. 29,2 мг альфа-кетоглутаровой кислоты и 1,78 г DL-аланина (или 0,89 г L-аланина) отвешивают на аналитических весах. Дальнейшая работа, как и с реактивом 3.

5. Раствор 2,4-динитрофенилгидразина. 19,8 мг реактива растворяют в небольшом количестве 1 н. раствора соляной кислоты при нагревании на водяной бане. После того как раствор остынет, объем его доводят соляной кислотой до 100 мл. На следующий день реактив фильтруют. Раствор хранят в посуде из темного стекла в холодильнике. Годен в течение года.

6. 0,4 н. раствор едкого натра, свободный от карбонатов. Бутыли с реактивом и дистиллированной водой закрывают пробками с поглотительными трубками, наполненными натронной известью или гидроокисью бария.

7. Стандартный раствор пировиноградноклислого натрия ($CH_3COCOONa$). 11 мг кристаллического пирувата натрия (белого цвета) растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, переносят в мерную колбу емкостью 100 мл и доводят объем раствора до метки водой. 1 мл раствора содержит 110 мкг пирувата натрия, что соответствует 88 мкг пировиноградной кислоты.

Оборудование. Фотоэлектроколориметр; весы аналитические; термостат.

Ход определения аспартатаминотрансферазы (АсАТ). Пробирку с 0,5 мл субстратного раствора для определения АсАТ нагревают 5 мин при температуре 37°С, добавляют 0,1 мл сыворотки и инкубируют при 37°С 60 мин. Затем добавляют 0,5 мл 2,4-динитрофенилгидразинового раствора и выдерживают 20 мин при комнатной температуре. Добавляют 5 мл 0,4 н. раствора едкого натра, тщательно перемешивают и оставляют для развития окраски на 10 мин при комнатной температуре. Измеряют на ФЭКе при 500—560 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 1 см против контроля.

Контроль ставят, как опыт, но раствор 2,4-динитрофенилгидразина добавляют до инкубации.

Ход определения аланинаминотрансферазы (АлАТ). В пробирку вносят 0,5 мл субстратного раствора для определения АлАТ и нагревают 5 мин при температуре 37°С. Затем вносят 0,1 мл сыворотки и ставят в термостат при 37°С на 30 мин. Дальнейший ход анализа осуществляют так же, как и при определении АсАТ.

Расчет активности ферментов проводят по калибровочному графику. Для его построения из стандартного раствора готовят ряд разведений, как указано в таблице 17.

17. Приготовление стандартных растворов пирувата натрия

№ пробирок	Стандартный раствор пирувата натрия, мл	Дистиллированная вода, мл	Пировиноградная кислота		Количество микромолей пировиноградной кислоты в 1 мл сыворотки за 1 ч инкубации	
			мкг	мкмоль	АсАТ	АлАТ
1	0,05	0,55	4,4	0,05	0,5	1,0
2	0,10	0,50	8,8	0,10	1,0	2,0
3	0,15	0,45	13,2	0,15	1,5	3,0
4	0,20	0,40	17,6	0,20	2,0	4,0
5	0,25	0,35	22,0	0,25	2,5	5,0

В пробирки приливают по 0,5 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина, далее пробы обрабатывают, как опытные.

Контрольную пробу ставят так же, как и стандартную, но вместо раствора пировиноградной кислоты добавляют дистиллированную воду. Подсчет активности фермента на микромоли пировиноградной кислоты, образовавшейся при инкубации 1 мл сыворотки в течение 1 ч при 37°С, проводят по следующей формуле:

$$X = \frac{C \cdot 10}{88}$$ — для аспартатаминотрансферазы;

$$X = \frac{C \cdot 2 \cdot 10}{88}$$ — для аланинаминотрансферазы,

где 10 — коэффициент для пересчета на 1 мл сыворотки; C — пировиноградная кислота, в мкг, найденная по калибровочному графику; 88 — масса 1 мкмоля пировиноградной кислоты в мкг; 2 — коэффициент пересчета на 1 ч инкубации.

Примечание. Сыворотка не должна быть гемолизированной. При хранении сыворотки в холодильнике активность ферментов не снижается в течение 5—7 дней.

Клиническое значение. Аминотрансферазы переносят аминогруппы от аминокислот к кетокислотам. АсАТ и АлАТ не обладают органной специфичностью. Однако определение их активности используют для диагностики болезни печени и сердца.

При гепатите резко повышается активность аланинаминотрансферазы, поражение миокарда сопровождается преимущественно возрастанием активности аспартатаминотрансферазы. Отмечено резкое повышение активности АсАТ и АлАТ при травматическом перикардите у коров. У здоровых животных активность АсАТ составляет 0,6—0,64 мкмоли пировиноградной кислоты на 1 мл сыворотки за 1 ч инкубации при 37°С (14—57 ед.), а активность аланинаминотрансферазы — 0,2—0,42 мкмоли. Для перевода единиц в микромоли в данных условиях необходимо величину разделить на 88.

Источники: 83.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПО РЕАКЦИИ С 2,4-ДИНИТРОФЕНИЛГИДРАЗИНОМ (МЕТОД СЕВЕЛА, ТОВАРЕК)

Принцип. L-лактат под действием фермента сыворотки в присутствии НАД окисляется в пируват; при реакции пирувата с 2,4-динитрофенилгидразином образуется окрашенный гидрозон пировиноградной кислоты, интенсивность окраски которого пропорциональна активности фермента.

Реактивы. 1. 0,45 моль/л раствор молочнокислого натрия. В мерную колбу емкостью 100 мл вносят 5 мл 80%-ной молочной кислоты (коммерческой), добавляют 2 н. раствор едкого натра до получения pH 7,5 и доводят объем дистиллированной водой до метки. Хранят в посуде из темного стекла в холодильнике.

2. 0,03 моль/л раствор натрия пирофосфата, pH 8,8. 6,69 г натрия фосфорнокислого пиро ($N_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$) растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, добавляют 1 н. раствор соляной кислоты до получения pH 8,8 и доводят объем дистиллированной водой до 500 мл. Стабилен в течение месяца при хранении в холодильнике.

3. Раствор никотинамидадениндинуклеотида (НАД). Готовят из расчета 3 мг НАД на 1 мл дистиллированной воды. Раствор стабилен в течение месяца при хранении в холодильнике.

4. Раствор 2,4-динитрофенилгидразина. 19,8 мг реактива растворяют в небольшом количестве 1 н. раствора соляной кислоты при нагревании в водяной бане. После охлаждения объем доводят 1 н. раствором соляной кислоты до 100 мл. На следующий день реактив фильтруют. Хранят его в посуде из темного стекла. Стабилен в течение года.

5. 0,4 н. раствор едкого натра (0,4 моль/л).

6. 1 н. раствор соляной кислоты (1 моль/л).

7. Калибровочный раствор пировиноградной кислоты. 11 мг кристаллического пировиноградноокислого натрия растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, переносят в мерную колбу емкостью 100 мл и доводят объем до метки дистиллированной водой. 1 мл раствора содержит 88 мкг пировиноградной кислоты.

8. Рабочий калибровочный раствор готовят разведением основного раствора в 10 раз дистиллированной водой.

Оборудование. Фотоэлектроколориметр; термостат; колбы мерные.

Ход определения. Опытная проба. 0,1 мл сыворотки, разведенной 1 : 2, смешивают с 0,3 мл раствора НАД, прогревают 5 мин при 37°С. Затем добавляют 0,8 мл 0,03 моль/л раствора натрия фосфорнокислого пиро и 0,2 мл 0,45 моль/л раствора молочнокислого натрия, предварительно прогретых при 37°С, и инкубируют смесь при 37°С 15 мин. Тотчас же после инкубации добавляют 0,5 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина, выдерживают 20 мин при комнатной температуре, добавляют 5 мл 0,4 н. раствора едкого натра, перемешивают и через 10 мин измеряют экстинкцию раствора на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 500—560 нм (зеленый светофильтр) против холостой пробы.

Холостую пробу ставят, как и опытную, но сыворотку добавляют после инкубации.

Подсчет активности проводят по калибровочному графику. Активность лактатдегидрогеназы выражают в микромолях пировиноградной кислоты, образовавшихся при инкубации 1 мл сыворотки в течение 1 ч при 37°С, или в микромолях секунду/л (мкмоль с/л). Для построения калибровочного графика из рабочего калибровочного раствора пировиноградноокислого натрия готовят ряд разведений, как указано в таблице 18.

18. Приготовление стандартных растворов натрия пирувата

№ п/п	Рабочий калибровочный раствор пирувата натрия, мл	0,03 моль/л раствора пирофосфорнокислого натрия, мл	Дистиллированная вода, мл	Содержание пировиноградной кислоты в калибровочной пробе		Активность в мкмолях за 1 ч на 1 мл сыворотки
				мкг	мкмоль	
1	0,1	0,8	0,5	0,88	0,01	1,2
2	0,2	0,8	0,4	1,76	0,02	2,4
3	0,4	0,8	0,2	3,52	0,04	4,8
4	0,6	0,8	—	5,28	0,06	7,2
5	0,8	0,6	—	7,04	0,08	9,6

Затем в пробирки приливают по 0,5 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина. Далее калибровочные пробы обрабатывают и измеряют, как опытные.

Холостую пробу ставят, как калибровочную, но вместо калибровочного раствора добавляют дистиллированную воду. Пересчет активности лактатдегидрогеназы на микромоли пировиноградной кислоты на 1 мл сыворотки за 1 ч инкубации при 37°С проводят по формуле:

$$\text{активность лактатдегидрогеназы в мкмоль ч/мл} = \frac{C \cdot 30 \cdot 4}{88},$$

где C — микрограммы пировиноградной кислоты в калибровочной пробе; 30 — коэффициент пересчета на 1 мл сыворотки; 4 — коэффициент пересчета на 1 ч инкубации; 88 — масса 1 мкмоля пировиноградной кислоты в мкг.

Прямолинейная зависимость между концентрацией пировиноградной кислоты и оптической плотностью сохраняется от 0 до 10 мкмоль ч/мл.

Примечания. 1. Сыворотка крови должна быть свободной от гемолиза. 2. Для исследования рекомендуют использовать свежую сыворотку. Фермент нестабилен при хранении сыворотки при температуре —8—20°С. 3. В качестве антикоагулянта не следует применять соли щавелевой кислоты, так как они ингибируют фермент.

Клиническое значение. Лактатдегидрогеназа ускоряет реакцию окисления молочной кислоты в пировиноградную. Нормальная величина от 0,6 до 4,5 мкмоли пировиноградной кислоты на 1 мл сыворотки за 1 ч инкубации при 37°С. Повышение активности ЛДГ отмечают при поражении миокарда, печени и почек. Причем при болезнях сердца преимущественно повышается активность изоферментов $ЛДГ_1$ и $ЛДГ_2$, а при паренхиматозном гепатите и нефрите — изофермента $ЛДГ_5$. Незначительное повышение активности ЛДГ наблюдают при анемиях, физическом напряжении, отравлениях, тиреотоксикозе, злокачественных опухолях. Все заболевания, при которых отмечается некроз тканей, сопровождаются повышением активности лактатдегидрогеназы.

Источник: 71.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПО ГИДРОЛИЗУ БЕТА-ГЛИЦЕРОФОСФАТА (МЕТОД БОДАНСКИ)

Принцип. Под действием фермента сыворотки крови бета-глицерофосфат натрия подвергается гидролизу с освобождением неорганического фосфора. По его количеству определяют активность фермента.

Реактивы. 1. Глицерофосфатный субстрат, pH 9±0,1. 2,15 г бета-глицерофосфата натрия и 2,12 г 5,5-диэтилбарбитуровой кислоты натриевой соли (мединал) растворяют в дистиллированной воде и доводят объем в мерной колбе на 500 мл до метки. Определяют pH буферного раствора. Хранят в холодильнике под слоем толуола 7—10 дней.

2. 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ).

3. Серная кислота концентрированная плотностью 1,84.

4. Раствор аммония молибденовокислого (ч.д.а.). 100 г вещества растворяют в 500 мл воды, подогретой до 50°С. После охлаждения приливают 100 мл концентрированной серной кислоты, снова охлаждают и переносят в мерную колбу на 1 л, доливают дистиллированной водой до метки.

5 Раствор аммония ванадиевокислого (ч.д.а.). 2,5 г вещества растворяют в 500 мл кипящей воды. Кипячение продолжают до тех пор, пока раствор не окрасится в желтый цвет. После охлаждения раствор переносят в мерную колбу на 1 л и доводят дистиллированной водой до метки.

6. Реактив на фосфор. Смешивают растворы молибдената и ванадата аммония в равных объемах. Реактив годен 2 мес.

7. Стандартный раствор фосфора основной. 0,439 г однозамещенного фосфата калия (х.ч.), высушенного над концентрированной серной кислотой, растворяют в 100 мл дистиллированной воды. В 1 мл раствора содержится 1 мг фосфора. Из него готовят рабочий стандартный раствор — 5 мл основного раствора доводят дистиллированной водой в мерной колбе до 100 мл.

Оборудование. Фотоэлектроколориметр; термостат; эксикатор; электроплитка.

Ход определения. В центрифужные пробирки вносят по 2,5 мл бета-глицерофосфатного субстрата и ставят в термостат при 37°С на 15 мин. На каждую пробу берут по 2 пробирки (№ 1 и 2) и на серию исследований по 2 пробирки на контроль (№ 3 и 4) и по 2 пробирки на стандарт (№ 5 и 6). Через 15 мин в пробирку № 1 добавляют 0,5 мл сыворотки и продолжают нагревать все пробирки в термостате при 37°С 60 мин (точно!). Пробы охлаждают. В пробирку № 2 вносят 0,5 мл сыворотки, № 3 и 4 — по 0,5 мл дистиллированной воды, № 5 и № 6 — по 0,5 мл рабочего стандартного раствора фосфора.

Во все пробирки вливают по 2 мл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, тщательно перемешивают стеклянной палочкой и центрифугируют 20 мин при 1500 об/мин. Затем берут 2,5 мл надосадочной жидкости, добавляют 2,5 мл реактива на фосфор, перемешивают стеклянной палочкой и дают стоять 2 ч. Центрифугируют 5 мин при 3000 об/мин.

Фотометрируют пробы и стандарт при длине волны 436 нм (фиолетовый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 1 см против контроля. Контроль ставят, как опыт, но вместо центрифугата берут 2,5 мл ТХУ и 2 мл дистиллированной воды. Расчет проводят по формулам:

$$X_1 = \frac{A_1}{B} \cdot 5; \quad X_2 = \frac{A_2}{B} \cdot 5;$$

$$X_1 - X_2 = \text{активность щелочной фосфатазы в ед.},$$

где A_1 — оптическая плотность исследуемой пробы после инкубации; A_2 — оптическая плотность испытуемой пробы до инкубации; B — оптическая плотность рабочего стандартного раствора фосфора; 5 — коэффициент (для 5 мг%-ного стандартного раствора фосфора); X_1 — количество мг неорганического фосфора, содержащегося в 100 мл сыворотки крови после ее инкубации; X_2 — количество мг неорганического фосфора, содержащегося в 100 мл сыворотки до инкубации.

Разница в содержании неорганического фосфора до и после инкубации условно обозначается единицами Бодански. По СИ активность фермента выражают в мкмолях неорганического фосфора на 1 мл сыворотки за 1 ч инкубации при 37°С:

$$X = \frac{a \cdot 1000 \cdot 4}{31},$$

где a — количество мг неорганического фосфора, найденного по калибровочному графику; 1000 — пересчет неорганического фосфора в мкг; 4 — коэффициент пересчета на 1 мл сыворотки; 31 — масса 1 мкмоля неорганического фосфора, мкг.

Примечание. Сыворотка не должна быть гемолизированной.

Клиническое значение. Щелочная фосфатаза, так же как и кислая фосфатаза, отщепляет остаток фосфорной кислоты от ее органических эфирных соединений. В сыворотке крови может быть фермент из костной ткани, печени, желчных путей, кишечника и других тканей. В норме активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови 1,2—5 ед. Бодански, или около 0,4—1,4 мкмоли на 1 мл за 1 ч инкубации при 37°С. Щелочная фосфатаза не является строго органоспецифическим ферментом. Значительное повышение ее активности отмечают при холангитах, рахите, остеодистрофии. Несущественные изменения находят при гепатитах, злокачественных новообразованиях, циррозе печени.

Источники: 51, 73.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ α-АМИЛАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ, МОЧЕ И ДУОДЕНАЛЬНОМ СОДЕРЖИМОМ АМИЛОКЛАСТИЧЕСКИМ МЕТОДОМ СО СТОЙКИМ КРАХМАЛЬНЫМ СУБСТРАТОМ (МЕТОД КАРАВЕЯ)

Принцип. α-амилаза гидролизует расщепление крахмала с образованием конечных продуктов, не дающих цветной реакции с йодом. Об активности α-амилазы судят по измерению уменьшения концентрации крахмала.

Реактивы. 1. Субстратно-буферный раствор, pH 7. 13,3 г безводного двузамещенного фосфорнокислого натрия и 4,3 г бензойной кислоты растворяют в 250 мл дистиллированной воды и доводят до кипения. Суспендируют 0,2 г растворимого крахмала (крахмал для колориметрии) в небольшом количестве холодной воды и вводят в кипящий раствор. Кипятят 1 мин, охлаждают и доводят дистиллированной водой до 500 мл. Стабилен при хранении при комнатной температуре 10—12 дней, должен быть прозрачным.

2. 0,1 н. основной раствор йода. 3.567 г йодноватокислого калия ($KJ7_3$) и 45 г йодистого калия (KJ) растворяют в 800 мл дистиллированной воды и медленно при помешивании добавляют 9 мл концентрированной соляной кислоты, затем объем доводят до 1 л дистиллированной воды.

3. 0,01 н. рабочий раствор йода. 25 г фтористого калия растворяют в 350 мл дистиллированной воды, добавляют 50 мл основного раствора йода и доливают дистиллированной водой до 500 мл. Хранят в посуде из темного стекла в хо-

лодильнике. Годен в течение месяца. Если в рабочий раствор йода не добавляют фтористый калий, то его нужно готовить ежедневно.

Оборудование. Фотоэлектроколориметр; термостат; пробирки; пипетки; мерные колбы; секундомер.

Ход определения. Опытная проба. 5 мл субстратно-буферного раствора вносят в колбу емкостью 50 мл, нагревают 5 мин при 37°С, добавляют 0,1 мл сыворотки или профильтрованной мочи или дуоденального содержимого (предварительно разведенного 0,85%-ным раствором хлористого натрия в 100 раз). Инкубируют 7,5 мин при 37°С. Время инкубации следует строго отсчитать по секундомеру с момента добавления биологической жидкости в крахмальный субстрат. Сразу же после инкубации добавляют 5 мл рабочего раствора йода и доводят объем дистиллированной водой до 50 мл. Измеряют на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 630—690 нм (красный светофильтр) против воды. Холостую пробу ставят, как и опытную, но биологическую жидкость добавляют после инкубации вместе с рабочим раствором йода. Измеряют при тех же условиях, что и опытную пробу, против воды.

Расчет активности α-амилазы выражают в мг крахмала, гидролизованного в мл биологической жидкости за 1 ч инкубации при 37°С. Рассчитывают по формуле:

$$\text{Активность амилазы в мг (ч. мл)} = \frac{E_1 - E_2}{E_1} \cdot 2 \cdot 8 \cdot 10 \cdot K =$$

$$= \frac{E_1 - E_2}{E_1} \cdot 160 \cdot K,$$

где E_1 — экстинкция холостой пробы; E_2 — экстинкция опытной пробы; 2 — количество мг крахмала, введенного в опытную и холостую пробы; 8 — коэффициент пересчета на 1 ч инкубации; 10 — коэффициент пересчета на 1 мл биологической жидкости; K — коэффициент разведения биологической жидкости.

При активности фермента выше 140 мг крахмала биологическую жидкость разводят 0,85%-ным раствором хлористого натрия и коэффициент разведения учитывают при расчете активности фермента.

В одной серии исследований должно быть не более 5—7 проб.

Клиническое значение. Фермент амилаза (диастаза) осуществляет гидролитическое расщепление полисахаридов до декстринов и мальтозы. Богаты амилазой сок поджелудочной железы и слюна. В кровь фермент поступает главным образом из поджелудочной железы, поэтому повышение активности амилазы в крови и моче бывает обычно при заболевании поджелудочной железы. Активность амилазы в крови и моче значительно повышается при остром панкреатите, а также при перитоните, язвенной болезни свиней, собак и других животных, заболеваниях почек. Повышение активности амилазы крови, как правило, сопровождается адекватным увеличением ее активности в моче. Исключение составляют нефрозы — при них активность амилазы сыворотки крови повышается, а мочи — снижается. Снижение активности амилазы крови и мочи наблюдают при гепатите, дистрофии печени, сахарном диабете, гипотиреозе, токсической диспепсии.

О нормативах активности α-амилазы в сыворотке крови, моче и других биологических субстратах судят по здоровым животным-аналогам. Ориентировочные нормативные величины активности амилазы в сыворотке крови 8—28 мг (ч.мл), в моче — до 110 мг (ч.мл), дуоденальном содержимом — 7—18 г (ч.мл).

Источник: 71.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ СОРБИТОЛДЕГИДРОГЕНАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПО РЕАКЦИИ С РЕЗОРЦИНОМ (МЕТОД СЕВЕЛА, ТОВАРЕК)

Принцип. d-сорбитол под действием фермента сыворотки в присутствии НАД превращается во фруктозу, при реакции фруктозы с резорцином образует-

ся розово-красное окрашивание, интенсивность которого пропорциональна интенсивности образовавшейся фруктозы.

Реактивы. 1. 0,5 моль/л раствор d-сорбитола на 0,05 моль/л трис-буфере. 0,225 г d-сорбитола (флакон № 1 по набору реактивов для определения активности сорбитолдегидрогеназы в сыворотке крови, производство СССР) растворяют в 2,5 мл 0,05 моль/л трис-буфера. Раствор стабилен 4 нед при хранении в холодильнике.

2. 0,05 моль/л трис-буфер, pH 8,8. 70,5 мг триса (оксиметиламинометан) (флакон № 2 по набору) растворяют в 2,5 мл дистиллированной воды, прибавляют 0,4 мл 0,2 н. раствора соляной кислоты. Проверяют pH. Доводят дистиллированной водой до 10 мл. Раствор стабилен в течение года при комнатной температуре.

3. 0,006 моль/л раствор никотинамид-аденин-нуклеотида (НАД). 25 мг НАД (флакон № 3 по набору) растворяют в 4,5 мл трис-буфера. Раствор стабилен 4 нед при хранении в холодильнике.

4. 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты (флакон № 4 по набору).

5. 0,1%-ный раствор резорцина в 96% этиловом спирте (флакон № 5 по набору).

6. 30%-ный раствор соляной кислоты.

7. 0,2 н. (0,2 моль/л) раствор соляной кислоты.

8. Калибровочный раствор фруктозы. 27 мг фруктозы растворяют в небольшом количестве 0,9%-ного раствора хлорида натрия, переносят в мерную колбу на 100 мл и доводят объем до метки 0,9%-ным раствором хлорида натрия (флакон № 6 по набору).

Оборудование. Фотоэлектроколориметр; термостат; колбы мерные; секундомер.

Ход определения. Опытная проба. В центрифужную пробирку вносят 0,1 мл 0,5 моль/л раствора d-сорбитола и 0,3 мл сыворотки, прогревают 5 мин при 37°С, затем добавляют 0,2 мл 0,006 моль/л раствора НАД, предварительно прогретого при 37°С, и инкубируют 30 мин при той же температуре. Инкубацию прерывают добавлением 0,4 мл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Центрифугируют. В чистую пробирку вносят 0,5 мл надосадочной жидкости, 0,5 мл раствора резорцина, 1,5 мл 30%-ного раствора соляной кислоты, перемешивают и помещают в водяную баню при 80°С на 8 мин, охлаждают. Розово-красное окрашивание измеряют на ФЭКе при длине волны 500—600 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 0,5 см против холостой пробы.

Холостую пробу ставят, как опытную, но раствор трихлоруксусной кислоты добавляют до инкубации.

Активность фермента рассчитывают по калибровочному графику. Активность сорбитолдегидрогеназы выражают в микромолях фруктозы, образовавшейся при инкубации 1 мл сыворотки в течение 1 ч при 37°С, или в нмолях фруктозы, образовавшейся при инкубации 1 л сыворотки в течение 1 с при 37°С. Для перевода мкмолей (ч.мл) в нмоли (с.л) найденную величину умножают на коэффициент 16,67.

Построение калибровочного графика. Из калибровочного раствора фруктозы готовят ряд разведений с добавлением реактивов, как указано в таблице 19. Далее калибровочные пробы помещают в водяную баню при 80°С на 8 мин, охлаждают и измеряют при тех же условиях, что и опытные пробы, против холостой пробы. В холостую пробу вместо калибровочного раствора добавляют 0,9%-ный раствор хлорида натрия.

Пересчет активности сорбитолдегидрогеназы на микромоли фруктозы на 1 мл сыворотки за 1 ч инкубации при 37°С проводят по формуле: активность сорбитолдегидрогеназы в мкмолях (ч.мл) $= C \cdot 3{,}3 \cdot 2 : 180$, где C — мкг фруктозы в калибровочной пробе; 3,3 — коэффициент пересчета на 1 мл сыворотки; 2 — коэффициент пересчета на 1 ч инкубации; 180 — относительная молекулярная масса 1 мкг фруктозы в мкг. Прямолинейная зависимость сохраняется от 0 до 3 мкмоль (ч.мл).

Примечания. 1. Сыворотка должна быть свободной от гемолиза. 2. Фермент сыворотки термостабилен. Чтобы избежать потери активности фермента, сыворотку рекомендуют хранить при температуре от —8 до —20°С.

19. Растворы фруктозы для построения калибровочного графика

№ пробирок	Калибровочный раствор фруктозы, мл	0,9%-ный раствор хлорида натрия	Раствор сорбитола	Трис-буфер	Раствор ТХУ	Раствор резорцина	0%-ный раствор соляной кислоты	Содержание фруктозы в пробе, мг	Активность, нмолях у мл сыворотки
1	0,2 калибровочного раствора, разведенного в 10 раз 0,9%-ным раствором NaCl	0,1	0,1	0,2	0,4	1,0	3,0	5,4	0,2
2	0,05	0,25	0,1	0,2	0,4	1,0	3,0	13,5	0,5
3	0,1	0,2	0,1	0,2	0,4	1,0	3,0	27,0	1,0
4	0,2	0,1	0,2	0,2	0,4	1,0	3,0	54,0	2,0
5	0,3	—	0,1	0,2	0,4	1,0	3,0	81,0	3,0

Клиническое значение. У здоровых животных в сыворотке крови активность сорбитолдегидрогеназы почти не проявляется. Она резко возрастает при гепатите, токсической дистрофии печени, гепатозе иной этиологии, например вследствие кетоза.

Источник: 71.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ γ-ГЛУТАМИЛТРАНСПЕПТИДАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ С СУБСТРАТОМ L-γ-ГЛУТАМИЛ-4-НИТРОАНИЛИДОМ

Принцип. γ-глутамилтранспептидаза (γ-ГТП) катализирует реакцию переноса L—γ-глутамилового остатка с L—γ-глутамил-4-нитроанилида на глицилглицин. Освобожденный в ходе реакции 4-нитроанилин служит мерой активности γ-глутамилтранспептидазы.

Реактивы. Активность γ-глутамилтранспептидазы можно определять набором реактивов, выпускаемым н/п «Лахема», ЧССР.

1. Субстрат — 4 таблетки (1 таблетка содержит 28 мг γ-глутамил-4-нитроанилида и 82 мг натрия хлористого).

2. Буферный раствор — 0,55 моль/л глицилглицина, pH 8,3 (11 мл).

3. Основной калибровочный раствор — 82,9 мг 4-нитроанилина на 100 мл (10 мл). Набор рассчитан на 50 определений.

Приготовление рабочих растворов реактивов.

1. Раствор субстрата. В пробирку наливают 10 мл дистиллированной воды и добавляют 1 таблетку субстрата. Таблетку измельчают стеклянной палочкой и при постоянном помешивании растворяют содержимое пробирки на кипящей водяной бане 60 с. Затем раствор охлаждают до 37°С и добавляют 2,5 мл буферного раствора. Приготовленный раствор субстрата во время работы хранят в водяной бане при 37°С, а неиспользованный его раствор можно держать в холодильнике 7 дней. Субстрат плохо растворим, при комнатной температуре выпадает осадок. Поэтому перед употреблением выкристаллизовавшийся субстрат растворяют нагреванием в кипящей водяной бане. Нагревание и растворение субстрата можно повторять не более 2 раз.

2. Раствор уксусной кислоты (в наборе его нет). 10 мл ледяной уксусной кислоты (ч.д.а.) доводят дистиллированной водой до 100 мл.

Оборудование. Спектрофотометр или фотоэлектроколориметр; водяная баня; пипетки, колбы мерные; пробирки; секундомер.

Ход определения. Опытная проба. В пробирку вносят 0,5 мл раствора субстрата и помещают в водяную баню с температурой 37°С, приливают 0,05 мл

сыворотки крови, содержимое переливают и инкубируют точно 15 мин при 37°С. Затем прибавляют 3 мл раствора уксусной кислоты и перемешивают.

Холостую пробу ставят, как и опытную, но сыворотку добавляют после инкубации. Измеряют на спектрофотометре при длине волны 410 нм, на ФЭКе при длине волны 400—500 нм (фиолетовый или синий светофильтр) в кювете с толщиной слоя 1 см против холостой пробы. Окраска стабильна в течение нескольких часов.

Активности γ-ГТП рассчитывают по калибровочной кривой. Для ее построения из основного калибровочного раствора готовят рабочие растворы, как указано в таблице 20.

20. Приготовление калибровочного раствора 4-нитроанилина

№ калибровочных растворов	Калибровочный раствор 4-нитроанилина, мл	Дистиллированная вода, мл	Активность γ-ГТП	
			мкмоль (мин.л) МЕ, Е/л	нмоль (с.л) коэффициент пересчета 16.67
1	0,25	3,75	25	417
2	0,50	3,50	50	833
3	1,00	3,00	100	1667
4	1,00	1,00	200	3344
5	1,50	0,5	300	5001
6	2,00	—	400	6668

В каждую из 6 пробирок вносят по 0,05 мл рабочих калибровочных растворов № 1—6, прибавляют по 3,5 мл раствора уксусной кислоты, перемешивают и измеряют экстинкцию против раствора уксусной кислоты при тех же условиях, что и опытную пробу. По полученным значениям строят калибровочный график зависимости экстинкции от активности фермента.

Расчет активности γ-ГТП проводят по калибровочной кривой. Активность выражают в мкмолях 4-нитроанилина, освобожденного 1 л сыворотки в течение 1 мин при 37°С (Е/л), или в единицах СИ — нмоль (с. л.). Перевод МЕ в единицы СИ: 1 МЕ=1 мкмоль (мин.л)=16,67 нмоли (с.л.).

Примечания. 1. Если полученная величина активности превышает 300 Е/л, то сыворотку следует развести физиологическим раствором и результаты умножить на коэффициент разведения. 2. Фермент сохраняет стабильность 1 нед (хранение при температуре 4°С) и 2—3 дня (при комнатной температуре). 3. Для увеличения точности количество реактивов и сыворотки увеличено вдвое по сравнению с набором.

Клиническое значение. γ-ГТП содержится в крови, желчи, моче, органах и тканях организма. Активность фермента в моче в 4—6 раз выше, чем в крови. В эритроцитах он отсутствует.

Активность γ-ГТП в сыворотке крови животных ориентировочно 8—90 Е/л (мкмоль/мин/л), или 130—1600 нмоль (с.л.). Активность γ-ГТП повышается при заболеваниях желчных путей, гепатитах, дистрофиях печени.

Источники: 33, 84.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФРУКТОЗО-1,6-ДИФОСФАТАЛЬДОЛАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ (МЕТОД В. И. ТОВАРНИЦКОГО, Е. Н. ВОЛУЙСКОЙ В МОДИФИКАЦИИ В. А. АНАНЬЕВА И В. Р. ОБУХОВОЙ)

Принцип. Фруктозо-1,6-дифосфатальдолаза катализирует реакцию расщепления субстрата (фруктозо-1,6-дифосфата), продукты распада которого (триозофосфаты) образуют с 2,4-динитрофенилгидразином гидрозон; последний в щелочной среде дает коричневатое окрашивание. По интенсивности окраски судят об активности фермента.

Реактивы. 1. Фруктозодифосфат (ФДФ), переведенный из бариевой соли в натриевую. Для ее приготовления 270 мг бариевой соли фруктозодифосфата растворяют в 3,5 мл 1 н. (1 моль/л) раствора соляной кислоты. К этому раствору прибавляют 1 мл 14%-ного (1 моль/л) раствора безводного сульфата натрия. Выпавший осадок сернокислого бария удаляют центрифугированием. Надосадочную жидкость проверяют на полноту осаждения ионов бария добавлением к центрифугату 1 капли 14%-ного раствора сернокислого натрия. Помутнение раствора свидетельствует о недостаточно полном осаждении ионов бария. Прозрачную жидкость сливают в колбу на 25 мл, подщелачивают 3%-ным раствором едкого натра до pH 7,4—7,6, пользуясь индикатором бромтимоловым синим. При таком значении pH появляется синее (не зеленоватое!) окрашивание. После установления pH объем раствора доводят дистиллированной водой до метки. При этом получается приблизительно 0,02 моль/л раствор натриевой соли фруктозодифосфата. Если к нему добавить несколько капель толуола, то он сохраняется в холодильнике 2—4 нед. Реактив разливают в пенициллиновые флаконы и хранят в замороженном состоянии. Перед употреблением оттаивают.

2. 0,1%-ный раствор 2,4-динитрофенилгидразина. 0,1 г реактива растворяют в 100 мл 2 н. (2 моль/л) раствора соляной кислоты. Для приготовления 2 моль/л раствора соляной кислоты в мерную колбу на 100 мл вносят 17 мл HCl плотностью 1,19 и доводят дистиллированной водой до метки. Растворение 2,4-динитрофенилгидразина в растворе соляной кислоты идет медленно, при подогревании в водяной бане. Готовый раствор фильтруют и хранят в темной склянке в холодильнике при 4°С.

3. 0,56 моль/л раствора гидразинасульфата. В мерной колбе на 100 мл растворяют 7,3 г гидразина сернокислого в небольшом количестве дистиллированной воды при постоянном взбалтывании, подщелачивают раствор 3%-ным раствором едкого натра до pH 7,4 (70—80 мл), после чего объем его доводят дистиллированной водой до метки. Подщелачивать гидразинасульфат можно 33%-ным раствором едкого натра.

4. 0,002 моль/л раствор монойодуксусной кислоты. 0,04 г кислоты растворяют в 80—90 мл дистиллированной воды, доводят 3%-ным раствором едкого натра до pH 7,4, а затем дистиллированной водой до 100 мл. Хранят в темной склянке в холодильнике при 4°С.

5. 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты.

6. 3%-ный раствор едкого натра.

7. 0,5%-ный раствор двууглекислого натрия ($NaHCO_3$).

8. 0,04%-ный раствор бромтимолового синего (индикатор). 0,01 г индикатора растворяют в 3,2 мл 0,02%-ного раствора едкого натра и доводят водой до 25 мл. Этим раствором индикатора пользуются при подщелачивании растворов 1, 3 и 4 до pH 7,4—7,6. После каждого прибавления щелочи на предметное стекло наносят каплю раствора и каплю индикатора. Добавляют едкий натр и в раствор до тех пор, пока капля не окрасится в синий цвет.

Оборудование. Фотоэлектроколориметр; водяная баня; ультратермостат; колбы мерные; пробирки центрифужные.

Ход определения. Предварительно готовят реактив № 1: раствор двууглекислого натрия 100 мл, раствор гидразина сульфата 25 мл, раствор монойодуксусной кислоты 25 мл, дистиллированной воды 25 мл. Смесь хранят в холодильнике при температуре 4°С. Непосредственно перед анализом готовят смесь № 2, состоящую из 0,25 мл раствора ФДФ и 1,75 мл смеси № 1.

Для опытной пробы в центрифужную пробирку вносят 0,1 мл сыворотки и 0,2 мл смеси № 2, а для контрольной — 0,1 мл сыворотки и 0,175 мл смеси № 1 (без раствора ФДФ). Пробирки опытной и контрольной проб помещают в термостат при 37°С на 1 ч. После инкубации в контрольную пробирку добавляют 0,025 мл раствора ФДФ. Дальнейший ход реакции в опытной и контрольной пробах идет одинаково. Белки осаждают добавлением 0,3 мл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, пробирки центрифугируют (можно без центрифугирования). К центрифугату добавляют по 0,6 мл 3%-ного раствора едкого натра, оставляют на 10 мин при комнатной температуре. Затем приливают по 0,6 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина, пробы помещают на 10 мин в термостат или водяную баню при 37°С, добавляют 4,2 мл 3%-ного раствора едкого натра и сразу же колориметрируют на ФЭКе при длине волны 530—540 нм

(зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 5 мм против дистиллированной воды. Из показаний опыта вычитают показания контроля и выражают активность альдолазы в условных единицах, представляющих величину экстинкции, умноженную на 100.

Примечания. 1. Растворы 2,4-динитрофенилгидразина, гидразина сульфата, монойодуксусной кислоты хранят в темном, прохладном месте. Если pH их больше 7,4, то гидразина сульфат подкисляют раствором серной кислоты, ФДФ-2 моль/л — раствором едкого натра, раствор монойодуксусной кислоты — раствором уксусной кислоты. 2. Активность фермента сохраняется неизменной, если сыворотку хранят при температуре 0—4°С в течение 3—4 дней. 3. Сыворотка не должна иметь следов гемолиза.

Клиническое значение. Фруктозо-1,6-дифосфатальдолаза катализирует обратную реакцию расщепления фруктозо-1,6-дифосфата на две молекулы фосфотриозы — фосфоглицериновый альдегид и монофосфат диоксиацетона. Наибольшая активность фермента в скелетной мускулатуре, сердечной мышце и в печени.

У здоровых животных в сыворотке крови находят следы фермента, в эритроцитах его в 100 раз больше, чем в сыворотке. Активность фермента в сыворотке крови значительно возрастает при дистрофических процессах в мышцах, например при миоглобинурии лошадей и крупного рогатого скота, при поражении мышцы сердца, а также при остром гепатите, вызванного гепатотропными ядами.

Источник: 47.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Принцип. Под действием холинэстеразы происходит гидролиз ацетилхолинхлорида с образованием уксусной кислоты и холина. Уксусная кислота сдвигает pH буферного раствора, что устанавливают по изменению его цвета с помощью индикатора.

Реактивы. 1. 0,9 моль/л раствор ацетилхолина хлористого. 1,67 г ацетилхолина хлористого растворяют в 10 мл дистиллированной воды. Сохраняют в холодильнике в течение 6—7 дней (из-за гигроскопичности открытую склянку с ацетилхолинхлоридом держат в эксикаторе).

2. Веронаповый буфер, pH 8,4. 1,5450 г натриевой соли веронала (мединала) растворяют в 500 мл дистиллированной воды, добавляют 9 мл 0,1 моль/л раствора соляной кислоты и 150 мл раствора индикатора. Объем доводят дистиллированной водой до 1 л. Буфер хранят в холодильнике в посуде из темного стекла. Годен в течение месяца.

3. Индикатор феноловый синий с переходом окраски от желтой к красной, pH 6,8—8,4. 0,1 г сухого индикатора растирают в ступке с 5,7 мл 0,05 моль/л едкого натра и после растворения объем доводят дистиллированной водой до 25 мл. Из полученного 0,4%-ного раствора готовят 0,01%-ный раствор разведением его дистиллированной водой в 40 раз.

4. 0,7%-ный водный раствор прозерина. 0,7 г прозерина растворяют в 100 мл дистиллированной воды.

5. 0,1 моль/л раствор уксусной кислоты. Готовят из стандарт-титра (фиксанала) или путем доведения дистиллированной водой 5,68 мл (6 г) ледяной уксусной кислоты до 1000 мл в мерной колбе соответствующего объема.

Оборудование. Фотоэлектроколориметр; водяная баня; ультратермостат; колбы мерные.

Ход определения. Опытная проба. В пробирку вносят 5 мл вероналового буфера, 0,2 мл дистиллированной воды и 0,1 мл сыворотки. Смесь прогревают 5 мин при температуре 37°С. Затем добавляют 0,2 мл раствора ацетилхолинхлорида и инкубируют 30 мин при температуре 37°С.

После инкубации добавляют 0,2 мл раствора прозерина. Экстинкцию измеряют на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 5 мм при длине волны 500—560 нм (зеленый светофильтр). Контроль ставят, как опыт, но раствор прозерина вносят вместе с ацетилхолинхлоридом. Из экстинкции контрольной пробы вычи-

тают экстинкцию опытной. Расчет ведут по калибровочному графику. Активность холинэстеразы выражают в микромолях уксусной кислоты на 1 мл сыворотки за 1 ч инкубации или в нмолях секунду на 1 л. В этом случае полученную величину умножают на коэффициент 277,8. Для построения калибровочного графика из 0,1 моль/л раствора уксусной кислоты готовят разведения, как указано в таблице 21.

21. Стандартные растворы уксусной кислоты

№ пробирок	0,1 моль/л раствор уксусной кислоты, мл	Дистиллированная вода, мл	Мкмоль уксусной кислоты	
			в стандартной пробе	в пересчете на 1 мл сыворотки и на 1 ч инкубации при температуре 37°С
1	2	8	4	80
2	4	6	8	160
3	6	4	12	240
4	8	2	16	320
5	9	1	18	360

Из каждого полученного раствора отбирают по 0,2 мл, добавляют 5 мл буфера и 0,1 мл сыворотки, прогревают 5 мин при температуре 37°С, вносят 0,2 мл раствора прозерина, 0,2 мл ацетилхолинхлорида. Смесь инкубируют 30 мин при температуре 37°С, быстро охлаждают. Измерение экстинкции проводят при тех же условиях, что и в опытной пробе. Контроль ставят, как опыт, но вместо стандартных растворов используют дистиллированную воду. Из экстракции контроля вычитают экстинкцию стандартной пробы. Полученную величину откладывают на оси ординат, количество мкмоль уксусной кислоты — на оси абсцисс.

Примечание. Активность холинэстеразы почти не изменяется, если сыворотку хранить в холодильнике при температуре 2—6°С в течение 4 дней.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЭКСПРЕСС-МЕТОДОМ С ПРИМЕНЕНИЕМ ИНДИКАТОРНОЙ БУМАГИ

Принцип. При контакте сыворотки с индикаторной бумагой под влиянием холинэстеразы отмечают гидролиз ацетилхолина, в результате чего освобождается уксусная кислота, которая изменяет pH и цвет индикатора. Реакция должна продолжаться до тех пор, пока pH не достигнет определенного уровня, а соответствующий этому цвет индикаторной бумаги не сравняется с цветом эталона. Мерой активности холинэстеразы является время (мин), на протяжении которого под влиянием сыворотки цвет индикаторной бумаги изменится до совпадения со цветом эталона.

Для определения активности холинэстеразы необходима специальная холинэкстразная индикаторная бумага; бумага-эталон (полоски бумаги с желто-зеленым цветом); микропипетки; предметные стекла; секундомер.

Ход определения. На поверхность чистого предметного стекла, лежащего на белой бумаге, микропипеткой наносят 0,05 мл сыворотки. На каплю сыворотки помещают конец индикаторной бумаги, пропитанной ацетилхолином и индикатором до границы с линией перфорации. Затем быстро накладывают второе предметное стекло, слегка прижимают его для того, чтобы сыворотка равномерно распределялась по полоске индикаторной бумаги. Рядом кладут бумагу-эталон. Определение активности фермента проводят при комнатной температуре (18—22°С).

Индикаторная бумага до ее соприкосновения с сывороткой имеет зеленый цвет, а после контакта цвет ее становится темно-зеленым или сине-зеленым. В ходе реакции он меняется в пределах различных оттенков зеленого цвета, в конце сравнивается с желто-зеленым цветом бумаги-эталона.

Отсчет времени ведут с момента контакта индикаторной бумаги с сывороткой до момента, когда цвет бумаги сравнивают с цветом эталона. Время от 7-й до 21-й минуты соответствует нормальной активности холинэстеразы сыворотки крови человека, меньше 6 мин — повышенной активности, а от 21-й до 60-й минуты и более — резкому снижению активности фермента.

Клиническое значение. Холинэстераза сыворотки крови расщепляет эфиры холина (ацетилхолин, бутирилхолин) на холин и соответствующую кислоту. Фермент синтезируется в гепатоцитах печени, поэтому степень активности холинэстеразы во многом зависит от состояния этого органа.

У здоровых животных активность холинэстеразы сыворотки крови ориентировочно 150—300 мкмоль (ч. мл). Уменьшение активности холинэстеразы отмечают при остром гепатите, гепатозе, отравлениях фосфорорганическими ядохимикатами.

Источник: 47.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИТРАТОВ И НИТРИТОВ В КОРМАХ, ВОДЕ И ДРУГИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СУБСТРАТАХ

При неравномерном внесении в почву больших доз азотных удобрений в кормах и воде могут накапливаться в завышенных дозах нитратный и нитритный азот. Поедание животными таких кормов приводит к нарушению обмена веществ, репродуктивной их функции и отравлению. В профилактике нитратного и нитритного токсикоза важное значение имеет систематический контроль за концентрацией нитратов и нитритов в кормах, воде, крови, молоке и других субстратах. Для этого используют фотометрические, ионометрические и другие методы исследования.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИТРАТОВ В КОРМАХ, КРОВИ, МОЛОКЕ И ПАТОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕАКТИВА ГРИССА

Принцип метода основан на извлечении нитратов из проб дистиллированной водой, восстановлении нитратов до нитритов металлическим цинком в растворе уксусной кислоты и взаимодействии последних с реактивом Грисса, в результате чего образуется азосоединение розово-красного цвета. Реакция специфична для нитратов! Чувствительность определения 40 мкг нитрат-ионов в пробе.

Реактивы. 1. Сульфаниловая кислота, ч.д.а.

2. Альфа-нафтиламин, ч.д.а.

3. Уксусная кислота концентрированная, х.ч.

4. Калий азотнокислый (KNO_3), х.ч.

5. Цинковая пыль.

6. Марганец сульфат, ч.д.а.

7. Реактив Грисса: а) 0,5 г сульфаниловой кислоты растворяют в 150 мл 12%-ного раствора уксусной кислоты; б) 0,1 г альфа-нафтиламина растворяют при нагревании в 20 мл дистиллированной воды, фильтруют и смешивают со 150 мл 12%-ного раствора уксусной кислоты. Растворы «а» и «б» хранят отдельно в холодильнике в течение 2 мес. Перед употреблением растворы смешивают 1 : 1.

8. Стандартный раствор нитрата калия основной. В мерной колбе на 1 л растворяют 1,630 г нитрата калия (высушенного до постоянной массы при 105°С) дистиллированной водой и доводят до метки. 1 мл этого раствора содержит 1 мг нитрат-ионов (NO_3^-). Хранят его в холодильнике в течение 3 мес.

9. Рабочий стандартный раствор нитрата калия. В мерную колбу на 100 мл переносят пипеткой 20 мл стандартного раствора нитрата калия основного и доводят объем до метки дистиллированной водой. 1 мл этого раствора содержит 0,2 мг (200 мкг) нитрат-ионов. Готовят перед анализом.

Оборудование. Фотоэлектроколориметр; химические пробирки; пипетки на 1, 5, 10 и 20 мл; мерные колбы на 100 и 1000 мл; конические колбы; химические стаканы; цилиндры на 10, 50 и 100 мл; мешочки или пленка для диализа.

Ход определения. Берут 10 г измельченного растительного или патологического материала, такое же количество гепаринизированной крови (молока). Извлечение нитратов из проб крови, молока, патологического материала и кормов, образующих окрашенные растворы, проводят методом диализа. Для этого измельченные пробы помещают в специальные мешочки или пленку (сухие пробы предварительно смачивают) и погружают в стаканчики или колбы с 50 мл дистиллированной воды на 2 ч. Затем диализат фильтруют в калиброванный сосуд, а мешочек с пробой еще раз погружают в 20 мл дистиллированной воды на полчаса в тот же сосуд. Затем мешочки с пробами вынимают, диализат фильтруют и объединяют с первым, доводя его объем до 100 мл. 6 мл диализата отбирают в пробирку для анализа на нитраты. При малом содержании нитратов в пробе диализат концентрируют до небольшого объема, фильтруют его, измеряют объем и берут 6 мл для анализа.

Для извлечения нитратов из проб растительного материала, образующих неокрашенные растворы, измельченные пробы помещают в конические колбы и заливают дистиллированной водой (50 мл). Извлечение проводят 1 ч, часто встряхивая колбы. Затем раствор фильтруют, пробу еще раз смывают 20-30 мл дистиллированной водой и объединяют с первой частью фильтрата, пропуская через тот же фильтр. Далее поступают, как описано выше.

В пробирку с 6 мл анализируемого фильтрата приливают 2 мл 10%-ной уксусной кислоты и вносят на кончике скальпеля смесь цинковой пыли с сульфатом марганца (1 г цинковой пыли предварительно тщательно перемешивают со 100 г сульфата марганца). Пробирку встряхивают полминуты. Затем в пробирку приливают 1 мл реактива Грисса, перемешивают ее содержимое и через 10 мин колориметрируют на ФЭКе при зеленом светофильтре (длина волны 536 нм) в кювете с толщиной слоя 10 мм против дистиллированной воды. Оптическую плотность окрашенного раствора определяют только при наличии прозрачного и бесцветного фильтрата. Расчет ведут по калибровочной кривой. Для приготовления шкалы стандартов в 8 химических пробирок наливают рабочий раствор в количестве, указанном в таблице 22.

22. Таблица для приготовления стандартных растворов

№ пробирок	Количество раствора, мл	Содержание NO_3^-, мг	№ пробирок	Количество раствора, мл	Содержание NO_3^-, мг
1	0,0	0,000	5	1,0	0,200
2	0,2	0,040	6	1,5	0,300
3	0,3	0,060	7	2,0	0,400
4	0,4	0,100	8	3,0	0,600

Объем в пробирках доводят до 6 мл дистиллированной водой, приливают в каждую пробирку 2 мл 10%-ной уксусной кислоты и вносят на кончике скальпеля (не более 30 мг) цинковую пыль с сульфатом марганца. Далее проводят все операции, как описано для опытных проб.

Для построения калибровочной кривой определяют оптическую плотность растворов в пробирках, как указано выше при определении проб.

Затем на оси абсцисс откладывают количество нитрат-ионов (мг), а на оси ординат — найденные значения оптической плотности растворов. Расчет проводят по формуле:

$$X = \frac{V_1 B \cdot 1000}{V_2 H},$$

где X — содержание нитратов (нитрат-ионов), мг/кг; B — содержание нитрат-иона, найденное по калибровочной кривой, мг; H — навеска анализируемого образца, г; V_1 — общий объем фильтрата, мл; V_2 — объем фильтрата, взятый для анализа, мл.

При необходимости пересчета в нитрат-калия найденное количество нитратиона следует умножить на 1,6, при этом получится количество нитрата калия (мг/кг).

Для выражения нитратов в мг% (мг/100 мл) пользуются формулой:

$$X \text{ мг } \% = \frac{V_1 B \cdot 100}{V_2 H},$$

Обозначения те же, что указаны в предыдущей формуле.

Пересчет результатов на абсолютно сухое вещество проводят по формуле:

$$X_1 = \frac{X \cdot 100}{(100 \cdot W)},$$

где X_1 — содержание нитратного азота ($N—NO_3$), мг/кг сухого вещества; X — содержание $N—NO_3$ в анализируемом материале, мг/кг; W — влажность материала, %; (W—100) — сухое вещество в анализируемом материале, %.

Если необходимо рассчитать содержание нитритного азота в процентах на абсолютно сухое вещество корма, пользуются формулой:

$$X_1 = \frac{X \cdot 100}{(100 - W) \cdot 10\,000} \text{ или } \frac{X}{(100 - W) \cdot 100},$$

где X_1 — содержание нитритного азота $N—NO_3$ в % сухого вещества; X — содержание $N—NO_3$ в анализируемом материале, мг/кг; W — влажность анализируемого материала, %; (100—W) — сухое вещество анализируемого материала, %; 100 — коэффициент пересчета в проценты.

Пример. В 1 кг зеленой массы кукурузы найдено 1000 мг нитратного азота. Влажность зеленой массы 75%.

В этом случае в 1 кг сухого вещества корма содержится:

$$\frac{1000 \cdot 100}{(100 - 75)} = 4000 \text{ мг } N—NO_3,$$

или в % на сухое вещество:

$$X = \frac{1000 \cdot 100}{20 \cdot 10\,000} = 0{,}4\% \; N—NO_3.$$

Эта методика дает возможность одновременно определить в одной и той же пробе как нитраты, так и нитриты. Подготовка проб для анализа в обоих случаях аналогична с применением водного извлечения или извлечения с помощью диализа. Из одного и того же фильтрата или диализа отбирают соответствующую часть для анализа на нитриты по 10 мл и на нитраты по 6 мл.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИТРИТОВ В КОРМАХ, КРОВИ И ПАТОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕАКТИВА ГРИССА

Принцип. Метод основан на извлечении нитритов из проб дистиллированной водой и взаимодействии их с альфа-нафтиламином и сульфаниловой кислотой в кислой среде с образованием азосоединения розово-красного цвета.

Реактивы. 1. Сульфаниловая кислота, ч.д.а.

2. Альфа-нафтиламин, ч.д.а.

3. Уксусная кислота, концентрированная, х.ч.

4. Натрий азотистокислый $NaNO_2$ (натрия нитрит), х.ч.

5. Реакция Грисса: а) 0,5 г сульфаниловой кислоты растворяют в 150 мл 12%-ного раствора уксусной кислоты; б) 0,1 г альфа-нафтиламина растворяют

при нагревании в 20 мл дистиллированной воды, фильтруют и смешивают со 150 мл 12%-ного раствора уксусной кислоты. Перед употреблением одну часть раствора «а» смешивают с равной по объему частью раствора «б». Растворы хранят отдельно.

5. Стандартный раствор нитрита натрия основной. 0,15 г высушенного при температуре 70—80°С $NaNO_2$ растворяют в 1 л дистиллированной воды. Раствор хранят в холодильнике, устойчив в течение месяца. 1 мл раствора содержит 0,100 мг NO_2.

6. Рабочий стандартный раствор нитрита натрия. 25 мл стандартного раствора нитрита натрия основного переносят в мерную колбу на 500 мл и доводят объем до метки дистиллированной водой. Раствор употребляют свежеприготовленным для построения калибровочной кривой. В 1 мл его содержится 0,0050 мг NO^-.

Оборудование. Фотоэлектроколориметр; химические пробирки; пипетки на 1 и 10 мл; мерные колбы на 1000 и 500 мл; конические колбы: химические стаканы; мешочки или пленка для диализа; цилиндры на 10, 50 и 100 миллилитров.

Ход определения. Берут 10 г измельченного растительного или животного материала, цельной крови или молока. В качестве антикоагулянта крови используют 1%-ный раствор гепарина. Пробы растительного происхождения, образующие при извлечении нитритов неокрашенные растворы, переносят в конические колбы и заливают 50 мл дистиллированной воды. Нитриты извлекают в течение 1 ч, часто встряхивая содержимое колбы. Затем раствор фильтруют, пробу еще раз смывают 30 мл дистиллированной воды, объединяют эту часть раствора с первой, пропуская через тот же фильтр. Доводят объем фильтрата до 100 мл и берут 10 мл для анализа на нитриты.

Извлечение нитритов из проб крови, молока, патологического материала и кормов растительного происхождения проводят методом диализа. Для этого измельченные пробы кормов, органов и тканей или пробы крови (молока) помещают в мешочки или пленку для диализа и погружают в сосуд с 50 мл дистиллированной воды на 2 ч. Затем диализат фильтруют в калиброванный сосуд, а мешочек с пробой еще раз погружают в 20 мл дистиллированной воды на полчаса в тот же сосуд. Этот диализат, фильтруя, объединяют с первым, доводят объем фильтрата до 100 мл. 10 мл фильтрата отбирают в пробирку для анализа на нитриты.

В пробирку с 10 мл анализируемого фильтрата добавляют 0,5 мл реактива Грисса и через 15 мин определяют оптическую плотность анализируемого раствора на ФЭКе при зеленом светофильтре (длина волны 536 нм) в кювете с толщиной слоя 10 мм против дистиллированной воды.

Расчет ведут по калибровочной кривой. Для приготовления шкалы стандартов в 10 пробирок вносят рабочий раствор в количествах, указанных в таблице 23.

23. Таблица для приготовления шкалы стандартов

№ пробирок	Количество раствора, мл	Содержание NO_2^-, мг	№ пробирок	Количество раствора, мл	Содержание NO_2^-, мг
1	0,2	0,001	6	1,2	0,006
2	0,4	0,002	7	1,4	0,007
3	0,6	0,003	8	1,6	0,008
4	0,8	0,004	9	1,8	0,009
5	1,0	0,005	10	2,0	0,010

Затем в пробирки вливают дистиллированную воду до объема 10 мл, в каждую пробирку вносят по 0,5 мл реактива Грисса. Через 15 мин после появления окраски определяют оптическую плотность в первых 7 пробирках. На оси абсцисс откладывают количество NO_2^- в мг, а на оси ординат — найденные значения оптической плотности растворов. Оптическую плотность определяют

только при наличии прозрачного и бесцветного фильтрата. В противном случае возможно только визуальное определение (сравнение опытной пробирки со стандартной шкалой). Рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{V_1 B \cdot 1000}{V_2 H},$$

где X — содержание нитритов (нитрит-ионов), мг/кг; B — содержание нитрит-ионов, найденное по калибровочной кривой, мг; H — навеска анализируемого образца, г; V_1 — общий объем фильтрата, мл; V_2 — объем фильтрата, взятый для анализа, мл.

При необходимости пересчета в нитрит натрия найденное количество нитрит-ионов умножают на коэффициент 1,5; при этом получается количество нитрита натрия (мг/кг). Если необходимо величину выразить в мг%, то в приведенной формуле берут не 1000, а 100.

Клиническое значение. При внесении в почву больших доз азотных удобрений (более 200—300 кг действующего начала на гектар) в растениях соли азотной кислоты — нитраты не используются полностью на синтез аминокислот и растительного белка, а накапливаются в них в концентрациях, вредных для животных и человека.

В процессе использования растениями нитратов образуются промежуточные продукты — нитриты и аммиак, которые значительно токсичнее исходного вещества — нитратов. Поступление в кровь нитритов и нитратов ведет к образованию метгемоглобина, кислородному голоданию, нарушению окислительно-восстановительных процессов и обмена веществ. У жвачных нитраты в рубце распадаются до нитритов и аммиака с последующим использованием азота этих метаболитов для синтеза аминокислот и бактериального белка. При значительном поступлении с кормом нитратов образовавшиеся из них нитриты и аммиак не успевают использоваться микрофлорой рубца, а всасываются в кровь, вызывая нарушение обмена веществ и токсикоз.

Для животных токсичной концентрации нитратов в кормах считают 0,21—0,52% сухого вещества корма. Наибольшая концентрация нитратов бывает в корнеплодах, зеленой массе кукурузы, ржи, пшеницы, овса, долголетних трав при внесении под эти культуры больших доз азотных удобрений. Снижается концентрация нитратов и нитритов в растениях, не достигая токсичной, при внесении азотных удобрений дробными дозами (в 2—3 приема за сезон), организации регулярного полива, а также в процессе провяливания и сушки трав, силосования зеленой массы. При поступлении в организм животных больших доз нитратов и нитритов, помимо резкого снижения метгемоглобина, падает уровень гемоглобина до 7 г% (и ниже), повышается количество общего белка в сыворотке крови до 8,9 г% (и более), коллоидно-осадочная проба (сулемовая, тимоловая) положительная. У здоровых животных при умеренном поступлении с кормом нитратов в крови и молоке их следы или вообще нет. При токсикозе количество нитратов в крови увеличивается и составляет 30—60 мг/л и более, их находят в определенном количестве и в молоке.

Источник: 72.

ИОНОМЕТРИЧЕСКИЙ ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИТРАТНОГО АЗОТА В ПОЧВАХ, КОРМАХ, ПРИРОДНЫХ ВОДАХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ СУБСТРАТАХ

Принцип. Метод основан на измерении активности нитрат-иона ионоселективным электродом в солевой суспензии 1%-ного раствора алюмокалиевых квасцов при соотношении пробы, и раствора квасцов 1 : 2,5 — для почв, 1 : 100— для сухих растений и кормов, 1 : 4 — для сырого растительного материала. Нитратный азот в почве можно определять также и в фильтратах водной и 0,05%-ной K_2SO_4 вытяжек, при соотношении пробы и экстракта 1 : 2,5.

Реактивы. 1. Калий азотнокислый, х.ч.

2. 1%-ный раствор алюмокалиевых квасцов, ч.д.а. Взвешивают 10 г алюмокалиевых квасцов (с погрешностью не более 0,1 г), растворяют в дистиллированной воде и доливают до 1 л.

3. 10%-ный раствор алюмокалиевых квасцов, ч.д.а. 100 г вещества растворяют дистиллированной водой в мерной колбе вместимостью 1 л.

4. 0,1 моль/л стандартный раствор калия азотнокислого (KNO_3). 10,11 г калия азотнокислого перекристаллизированного, высушенного при температуре 100—105°С до постоянной массы взвешивают с погрешностью не более 0,01 г, растворяют в 1%-ном растворе алюмокалиевых квасцов в мерной колбе на 1 л и доводят объем раствора до метки. Из этого раствора последовательным 10-кратным разбавлением экстрагирующим раствором готовят стандартные растворы с концентрацией 0,01 моль/л, 0,001 моль/л, 0,0001 моль/л. Полученные растворы используют для калибровки прибора.

Оборудование. Иономер ЭВ-74, pH-милливольтметр (pH 340, pH 121) или аналогичный прибор с погрешностью измерения ±5 мВ (±0,5 pNO_3); ионоселективный нитратный электрод НПО «Квант» или ЭМ-NO_3-0,1; электрод сравнения — хлорсеребряный насыщенный электрод типа ЭВЛ-1М по ГОСТ 5.1582—72; весы аналитические, погрешность взвешивания не более 0,001 г; весы технические, квадратные, погрешность взвешивания не более 0,1 г; дозатор вместимостью 50 мл для добавления алюмокалиевых квасцов, погрешность дозирования не более 1%; мешалка лабораторная для перемешивания образца с экстрагентом; гомогенизатор или фарфоровая ступка с пестиком и промытый, прокаленный песок; мезгообразователь, мясорубка или пластмассовая терка (для измельчения корнеплодов и овощей); встряхиватель или ротатор Р-120; блок экстрагирования БЭ-1; мельницы для размола сухих образцов почв и сухих проб растений.

Подготовка электрода. Мембранный нитратный электрод ЭМ-NO_3=0,1 перед началом работы в соответствии с инструкцией заполняют раствором 0,1 н. (0,1 моль/л) по KNO_3 и 0,005 н. (0,005 моль/л) по KCl (10,11 г KNO_3); 0,37 г KCl растворяют водой в мерной колбе вместимостью 1000 мл и доводят до метки дистиллированной водой. Затем в течение суток электрод выдерживают в 0,1 моль/л растворе KNO_3. Необходимо следить за уровнем растворов в измерительном и вспомогательном электродах, он должен быть постоянным. В промежутках между работой нитратный мембранный электрод хранят в растворе 10^{-3} моль/л KNO_3, а электрод сравнения — в дистиллированной воде.

Работоспособность нитратного ионоселективного электрода зависит от его характеристики: если при измерении стандартных растворов разность показаний между двумя растворами составляет величину меньше 48—50 мВ, то электрод находится в нерабочем состоянии. Электрод имеет линейную функцию в диапазоне 1—4 pNO_3, с наклоном 54—56±3 мВ на единицу pNO_3.

Подготовка проб к анализу. Образцы почв, поступившие на анализ для определения нитратного азота в сухом материале, высушивают при температуре до 40°С, измельчают и пропускают через сито с отверстиями диаметром 2 мм.

Образцы почв, поступившие для определения нитратного азота в сыром материале, тщательно перемешивают и пропускают через сито с отверстиями диаметром 5 мм. Затем не менее чем из пяти мест отбирают пробу для анализа.

Сырой травянистый материал измельчают ножницами и после отбора средней пробы берут навеску массой 12,5 г. Навеску помещают в стакан гомогенизатора, приливают 50 мл 1%-ного раствора алюмокалиевых квасцов и гомогенизируют 1 мин при 6000 об/мин. При отсутствии гомогенизатора навески массой 12,5 г растирают в ступке до однородной массы, переносят в банки с 50 мл 1%-ного раствора алюмокалиевых квасцов. Кассеты закрывают крышками и перемешивают на ротаторе или встряхивают 3 мин.

Картофель, корнеплоды и овощи перед анализом отмывают от земли, обсушивают фильтровальной бумагой и растирают на терке или в мясорубке.

Образцы сухого растительного материала измельчают на мельнице до размера частиц не более 1 мм.

Воду для анализа быстро доставляют в лабораторию и хранят при температуре 3—4°С в холодильнике не более суток. Перед длительной транспортировкой пробу воды на месте консервируют серной кислотой из расчета 1 мл/л или

хлороформом из расчета 2—4 мл на 1 л воды. Подобным образом поступают при подготовке крови и молока.

Проведение анализа. Пробы почвы массой 20 г помещают в банки, установленные в 10-позиционную кассету, приливают дозатором 50 мл 1%-ного раствора алюмокалиевых квасцов и перемешивают почву с раствором на электромеханической мешалке или ротаторе в течение 3 мин. В полученной суспензии нитратным ионоселективным электродом измеряют активность иона нитрата.

Пробы сухого растительного материала или корма массой 0,5 г помещают в банки, установленные в 10-позиционную кассету, приливают 50 мл 1%-ного раствора алюмокалиевых квасцов, закрывают крышкой и взбалтывают 30 мин. В полученной суспензии измеряют активность иона нитрата.

Образцы травянистых растений после гомогенизации переливают в банки и измеряют в полученной суспензии активность иона нитрата.

Из измельченных на терке или мясорубке овощей, корнеплодов или картофеля отбирают среднюю пробу массой 12,5 г, заливают 50 мл 1%-ного раствора алюмокалиевых квасцов и взбалтывают в течение 30 мин на встряхивателе или роторе. В полученной суспензии измеряют активность иона нитрата.

При исследовании воды к 9 мл анализированной воды добавляют 1 мл 10%-ного раствора алюмокалиевых квасцов. Объем воды и раствора квасцов можно увеличить соответственно в 2—5 раз, не меняя соотношения пробы воды и раствора квасцов (9 : 1). В полученном растворе измеряют активность иона нитрата.

Подобным образом готовят образцы крови и молока. Смесь крови (молока) с раствором алюмокалиевых квасцов взбалтывают 30 мин на встряхивателе или роторе. В полученной суспензии измеряют активность иона нитрата.

Измерение активности иона нитрата и порядок работы. Активность иона нитрата в пробе можно измерять непосредственно в pNO_3 или делать замеры в мВ.

1. Измерение активности иона нитрата в pNO_3. При измерении pNO_3 на милливольтметрах типа pH-340 следует поставить тумблер «род работы» в положение «pH», измерительный нитратный электрод подключить к гнезду «ВСП», а вспомогательный хлорсеребряный электрод — к гнезду «ИЗМ».

Ежедневно перед началом работы нитратный ионоселективный электрод помещают на 10 мин в дистиллированную воду, затем оба электрода (измерительный и вспомогательный) вынимают из воды, обсушивают фильтровальной бумагой и проводят настройку прибора по трем стандартным (контрольным) растворам KNO_3 — 0,0001 моль/л, 0,001 моль/л, 0,01 моль/л, начиная с меньшей концентрации; pNO_3 этих растворов соответственно равен 4, 3, 2.

Настройку потенциометра проверяют не менее 2 раз в день. При этом каждый раз для измерения нужно наливать свежую порцию стандартных растворов. После измерения активности растворов с большей концентрацией иона нитрата электрод выдерживают 3—4 мин в дистиллированной воде. Температура стандартных и измеряемых растворов должна быть одинаковой.

Для настройки pH-метра в единицах pNO_3 необходимо пользоваться ручками «$E_н$ грубо» и «$E_н$ точно» и температурным тумблером, устанавливая на приборе величины pNO_3, равные 4 и 3. Ручкой «S» устанавливают величину pNO_3, равную 2. Отсчеты показаний снимают по верхней шкале в диапазоне 300 мВ, работая в необходимых пределах измерения, соответствующих данной электродной паре.

Электроды перед погружением в исследуемые растворы тщательно обмывают дистиллированной водой (остатки воды удаляют фильтровальной бумагой). После перемешивания суспензии снимают показания прибора в величинах pNO_3.

Почвенную суспензию следует перемешивать до погружения в нее электродной пары с помощью стеклянной палочки.

Показания с прибора снимают через 1 мин при измерении в 1%-ной алюмокалиевой суспензии или вытяжке, через $1^1/_2$ мин при использовании 0,05%-ной K_2SO_4-вытяжки и через 2 мин при использовании дистиллированной воды.

2. Измерение активности нитратного иона в мВ. Определение нитратного азота с помощью ионоселективного электрода можно проводить, используя калибровочный график и снимая показания в мВ. В этом случае нитратный электрод подключают к гнезду «ИЗМ», а хлорсеребряный электрод — к гнезду

«ВСП». Тумблер «род работ» ставят в положение «± мВ» и проводят измерение ЭДС электродной пары в стандартных и анализируемых растворах. Активность ионов нитрата в пробах находят при помощи калибровочного графика, построенного на миллиметровой бумаге. На оси абсцисс откладывают величины pNO_3, соответствующие стандартным растворам азотнокислого калия, в молях: 2 pNO_3—10^{-2}M, 3 pNO_3—10^{-3}M, 4 pNO_3—10^{-4}M; на оси ординат — ЭДС, мВ.

При измерении активности иона нитрата на иономере ЭВ-74 в величинах pNO_3 нажимают клавишу «анионы — катионы», включают диапазон измерения pH = 1 + 4 и настраивают прибор по двум стандартным растворам: 4 pNO_3(10^{-4}M KNO_3) с помощью резистора «калибровка», 2 pNO_3(10^{-2}M KNO_3) резистором «температура раствора».

При замере величин pNO_3 нажимают клавишу «pX», при отключении цепи — клавишу «t». На стекле шкалы обозначают (пишут) слева направо 4, 3, 2, 1 pNO_3 соответственно цифрам 0, 1, 2, 3 средней шкалы прибора.

При измерении активности иона нитрата на иономере в мВ нажимают клавишу «мВ», включают диапазон измерения pH = 1 + 4 и делают замеры ЭДС (мВ) в стандартных и исследуемых растворах.

По калибровочному графику находят величину pNO_3.

Обработка результатов. С помощью вспомогательных таблиц (приложения 8—10) по величинам pNO_3 находят содержание нитратного азота в исследуемых объектах (мг/кг, мг/л). Содержание азота нитратов (мг/кг) в анализируемом материале рассчитывают по формуле:

$$X = 10^{-pNO_3} \cdot 14 \cdot \frac{B}{H} \cdot 10^3,$$

где X — содержание $N-NO_3$ в анализируемом материале, мг/кг; 14 — атомная масса азота, г; B — объем экстрагируемого раствора, мл; H — навеска анализируемого материала, г; 10^3 — коэффициент перевода в мг; pNO_3 — отрицательный логарифм концентрации ионов нитратов.

$$(\log C_{N-NO_3}), \quad \text{то есть} \quad C_{N-NO_3} = 10^{-pNO_3}.$$

Преобразование формул позволило упростить расчеты для соответствующих соотношений пробы и экстрагирующего раствора.

1. Для почв при соотношении почвы и раствора 1 : 2,5.

$$\text{Содержание } N-NO_3 \text{ мг/кг} = \text{Antilog}\,(4{,}54 - pNO_3). \qquad (1)$$

2. Для растений и кормов:

а) соотношение пробы и раствора 1 : 100 (для сухих проб)

$$\text{Содержание } N-NO_3 \text{ мг/кг} = \text{Antilog}\,(6{,}15 - pNO_3); \qquad (2)$$

б) соотношение пробы и раствора 1 : 4 (для влажных проб)

$$\text{Содержание } N-NO_3 \text{ мг/кг} = \text{Antilog}\,(4{,}75 - pNO_3). \qquad (3)$$

При соотношении пробы и 10 %-ного раствора алюмокалиевых квасцов 9 : 1 формула для расчета содержания азота нитратов в воде (крови, молоке) следующая:

$$N-NO_3 \text{ мг/л} = 10^{-pNO_3} \cdot \frac{10}{9} \cdot 14 \cdot 10^3, \text{ то есть} = 10^{-pNO_3} \cdot 10^{1,19} \cdot 10^3,$$

$$\text{то есть } 10^4 \cdot 19^{-pNO_3} = \text{Antilog}\,(4{,}19 - pNO_3) \text{ мг/л}. \qquad (4)$$

Антилогарифмы находят по таблицам или с помощью логарифмической линейки. Например, показание прибора — 2,80 pNO_3, а соотношение пробы и раствора — 1 : 100. По формуле (2) содержание $N-NO_3$ мг/кг = Antilog (6,15—pNO_3) = Antilog, (6,15—2,80) = Antilog 3,35; Antilog 3,35 = 2,240, так как антилогарифмы мантиссы (дробная часть логарифма) 35 = 2240, а характеристика равна 3, что означает 10^3, то есть в целую часть результата выделяется число цифр на единицу больше, чем число единиц характеристики.

Таким образом, в данной пробе содержится 2240 мг/кг $N-NO_3$.

При необходимости пересчета результата в абсолютно сухое вещество пользуются формулой:

$$X_1 = \frac{X \cdot 100}{100 \cdot W},$$

где X_1 — содержание $N-NO_3$ в мг/кг сухого вещества; X — содержание $N-NO_3$ в анализируемом материале, рассчитанное по одной из формул, мг/кг; W — влажность материала, %; 100 — коэффициент пересчета в %.

Содержание нитратного азота чаще рассчитывают в процентах на сухое вещество корма по формуле:

$$X_1 = \frac{X \cdot 100}{(100 - W) \cdot 10\,000}, \text{ или } \frac{X}{(100 - W) \cdot 100},$$

где X_1 — содержание $N-NO_3$ в % сухого вещества; X — содержание $N-NO_3$ в анализируемом материале, мг/кг; W — влажность материала, %; $(100 - W)$ — сухое вещество в материале, %; 100 — коэффициент для пересчета в % $N-NO_3$ от сухого вещества материала.

Клиническое значение см. в предыдущем методе.

Источник: 74.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МОЛОКА (МОЛОЗИВА)

ОТБОР ПРОБ МОЛОКА (МОЛОЗИВА) ДЛЯ АНАЛИЗА

В связи с тем что кислотность, содержание витаминов, жира, белка, минеральных и других веществ в молозиве сильно меняются, исследование его проводят по удоям, начиная с первого. Молоко появляется у коров на 7-е сутки после отела.

Пробы молозива и молока берут только из здоровых четвертей вымени. Поэтому перед анализом необходимо диагностировать клинические и субклинические маститы.

Для исследования молока (молозива) из утреннего удоя отбирают среднюю пробу нужного объема, вносят в склянку и закрывают пробкой. Пробы в термосе со льдом доставляют в лабораторию, где обрабатывают их с учетом характера проводимого анализа.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ В МОЛОКЕ (МОЛОЗИВЕ) АЦЕТОНОВЫХ ТЕЛ РЕАКТИВОМ ЛЕСТРАДЕ

Ацетоновые тела в молоке обычно обнаруживают с помощью реактива Лестраде по прописи: натрия натропруссидного [$Na_2(Fe(NO)(CN)_5 \cdot 2H_2O$] — 1 ч, аммония сернокислого [$(NH_4)_2SO_4$] — 20 ч, натрия углекислого безводного (Na_2CO_3) — 20 ч. Компоненты мелко измельчают в фарфоровой ступке в однородный порошок, который помещают в склянку из темного стекла с пробкой. Хранят 1—2 мес.

Ход обнаружения. Анализ проводят непосредственно на ферме или в лаборатории. Пробу молока в количестве 10—20 мл берут из здоровой четверти вымени. На фильтровальную бумагу наносят около 0,2 г реактива Лестрада и смачивают его 2—3 каплями молока. Через 40—60 с читают реакцию. Появление сиреневой окраски свидетельствует о наличии в молоке более 10 мг% ацетона и ацетоуксусной кислоты (такова степень чувствительности реактива). Животные, у которых исследуют ацетоновые тела в молозиве и молоке, не должны иметь признаков эндометрита, задержания последа, хирургической инфекции, травматического ретикулоперитонита и перикардита. При этих заболеваниях в моче и молоке повышается содержание кетоновых тел, главным образом за счет бета-оксимасляной кислоты.

Клиническое значение. В молоке и молозиве здоровых животных сумма кетоновых тел (бета-оксимасляная, ацетоуксусная кислота и ацетон) составляет не более 8 мг/100 мл. Из них на долю ацетоуксусной кислоты и ацетона приходится около $^1/_4$—$^1/_5$ части. Такую концентрацию реактивом Лестраде обнаружить невозможно. При заболевании коров кетозом, в разгар кетогенеза идет нарастание концентрации кетоновых тел не только в крови, но в такой же степени и в молоке (молозиве). Обнаружение ацетоновых тел в молоке (молозиве) коров и овец с помощью реактива Лестраде является характерным признаком кетоза. При других заболеваниях, протекающих со вторичной кетонурией, ацетонолактии, как правило, не бывает.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ В МОЛОКЕ (МОЛОЗИВЕ) КЕТОНОВЫХ ТЕЛ, ОБЩЕГО КАЛЬЦИЯ, НЕОРГАНИЧЕСКОГО ФОСФОРА, МАГНИЯ, МОЧЕВИНЫ, ВИТАМИНА А

Определение в молоке (молозиве) кетоновых тел проводят в безбелковом фильтрате йодометрическим методом (см. стр. 92), общего кальция — комплексонометрическим методом с флуороксеном (стр. 106), неорганического фосфора — с ванадат-молибденовым реактивом (стр. 109), магния — по цветной реакции с титановым желтым (стр. 126), мочевины — по цветной реакции с диацетилмонооксимом (стр. 75). Витамин А определяют в цельном молоке (молозиве) по методу Бессея в модификации А. А. Анисовой (стр. 126). Содержание кетоновых тел, общего кальция, неорганического фосфора, магния и мочевины определяют по указанным выше методикам в обезжиренном молоке. Для этого его центрифугируют 20 мин при 4000—5000 об/мин, верхний слой (жир) удаляют, а оставшуюся часть сливают в пробирку, закрывают резиновой крышкой и хранит в холодильнике.

Клиническое значение. Нормативы показателей молока и молозива коров приведены в приложении 12. Нами установлено, что содержание кетоновых тел и мочевины в молоке и молозиве коров находится в прямой корреляционной связи с содержанием этих веществ в крови. При этом концентрация мочевины в крови и молоке идентична, а содержание кетоновых тел в молоке примерно на $^1/_3$ выше, чем в крови. Повышение концентрации кетоновых тел в молоке и молозиве выше нормативной свидетельствует о развитии кетоза. Это заболевание сопровождается снижением содержания в молоке мочевины, что связано, очевидно, с уменьшением мочевинообразовательной функции печени.

Таким образом, показатели кетоновых тел и мочевины в молозиве и молоке могут служить диагностическими тестами при кетозе. Концентрация мочевины в молоке и молозиве повышается при поступлении в организм больших количеств нитратного азота.

Содержание витамина А в молозиве и молоке также находится в прямой зависимости от концентрации его в крови. Поэтому степень обеспеченности организма витамином А можно оценивать по концентрации его в молозиве или молоке.

Что касается минеральных элементов (кальций, фосфор, магний), то эти показатели в молоке и молозиве имеют меньшее клиническое значение.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИСЛОТНОСТИ МОЛОКА (МОЛОЗИВА) ПО ТЕРНЕРУ

Реактивы. 1. 0,1 н. раствор едкого натра (или калия).

2. 1%-ный раствор фенолфталеина. 1 г фенолфталеина растворяют в 70 мл 96%-ного этилового спирта и доводят водой до 100 мл.

3. 2,5%-ный раствор сульфата кобальта.

Оборудование. Бюретка; колба или стакан емкостью 100—200 мл; пипетки на 10 и 25 мл.

Ход определения. Отбирают среднюю пробу молока утренней дойки из здоровых четвертей вымени. В колбу или стакан емкостью 100—200 мл вносят 10 мл молока, 20 мл дистиллированной воды и 3 капли 1%-ного раствора фенолфталеина, перемешивают и титруют из бюретки 0,1 н. раствором едкого натра (или калия) до появления не исчезающего в течение 30 с розового окрашивания.

В качестве эталона окраски можно использовать 2,5%-ный раствор сернокислого кобальта. В колбочку вносят 10 мл молока, 20 мл дистиллированной воды, 1 мл 2,5%-ного раствора сернокислого кобальта, взбалтывают и ставят на белую бумагу рядом с бюреткой для титрования. Таким образом

проводят визуальное сравнение окраски исследуемых проб молока. Расчет ведут по формуле: $X = A \cdot 10$, где X — кислотность молока (молозива) в градусах Тернера, что равно числу миллилитров 0,1 н. раствора едкого натра, затраченного на нейтрализацию кислотности 100 мл молока; A — число мл 0,1 н. раствора едкого натра (или калия), пошедшего на титрование 10 мл молока; 10 — коэффициент для пересчета кислотности в 100 мл молока.

Клиническое значение. Кислотность свежего молока в среднем 16—19°, а у молозива первого удоя — 45—55°, первого дня — 39°, второго дня — 33, третьего дня — 27,3, шестого дня — 20,3, седьмого дня — 19,5°. Кислотность в основном является показателем свежести и степени загрязненности молока.

Правда, при ацидотическом состоянии у коров кислотность молока может также повышаться.

Кислотность молозива снижается при неполноценном кормлении сухостойных коров, а это является, в свою очередь, предрасположением новорожденных телят к диарее.

Источники: 31, 45, 75.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МОЧИ

ПОЛУЧЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ МОЧИ

Объективная оценка изменений в моче при ее анализе во многом зависит от методов получения. Чем меньше интервал времени между взятием мочи и исследованием, тем точнее анализ. Мочу удобнее собирать при естественном мочеиспускании. У коров и кобыл акт мочеиспускания можно вызвать путем массажа срамных губ. У мелких животных мочевой пузырь массажируют через брюшную стенку. Перед получением мочи необходим туалет наружных половых органов.

Однако при свободном мочеиспускании мочу получить можно не всегда, особенно у мелких и промысловых животных. Поэтому прибегают к катетеризации, используя мягкие и полужесткие катетеры. Этим методом можно не только получить мочу для исследования, но и полностью опорожнить мочевой пузырь. У промысловых и других мелких животных мочу собирают в предварительно хорошо промытые мочеприемники.

Чтобы избежать повреждений уретры, перед введением катетер следует осмотреть — нет ли на нем различных шероховатостей, трещин, царапин. Затем его обрабатывают в теплом дезрастворе или кипятят. Катетер легко вводится, если его смазать вазелиновым маслом или жидким парафином. Для крупных животных (лошадей, коров) применяют катетер диаметром 7—10 мм, длиной 70—90 см. Жеребцу или мерину перед катетеризацией делают массаж мочевого пузыря через прямую кишку (для выведения пениса) или пальцами правой руки, введенными в препуций, захватывают головку пениса и выводят ее из препуция. Фиксируя левой рукой через марлю головку пениса, правой рукой медленно вводят на небольшую глубину подготовленный катетер, затем его осторожно продвигают дальше до появления мочи.

У кобыл получить мочу при помощи катетера нетрудно. Вначале пальцами левой руки открывают срамную щель, а правой рукой вводят конец катетера по вентральной стенке преддверия влагалища. Указательный палец левой руки смазывают вазелином и через нижний угол срамной щели попадают им в уретру. Затем катетер продвигают по нижней стороне пальца и под его контролем вводят в мочевой пузырь. У коров и свиней введенный по вентральной стенке влагалища указательный палец попадает у входа в уретру в слепой мешок, в верхней части которого находится отверстие мочевого канала. Пальцем расширяют отверстие мочевого канала и под его контролем вводят катетер в мочевой пузырь.

У кобелей для получения мочи используют катетер диаметром 2—4 мм и длиной 30—40 см, а для небольших кобелей можно применять и медицинские катетеры. Собаку фиксируют в спинном или боковом положении так, чтобы таз был несколько приподнят. Затем пальцами левой руки лаборант берет половой член за опухолевыми узелками и выводит его из препуция. Указательным и средним пальцами левой руки препуций оттягивают назад, большим, безымянным и малым пальцами пенис фиксируют. Правой рукой осторожно вводят подготовленный катетер. У сук катетеризацию осуществляют так же, как и у кобыл. Для крупных сук можно брать медицинский или укороченный мужской катетер.

Противопоказанием для взятия мочи катетером является гнойное воспаление мочеиспускательного канала. У быков, баранов, хряков из-за сигмообразно-

го изгиба пениса катетеризация затруднена, проводят ее обычно с применением новокаиновой блокады.

Если нельзя немедленно исследовать мочу, ее хранят в закрытой посуде в холодильнике или консервируют толуолом (покрывают тонким слоем поверхность мочи), тимолом (1—2 кристаллика на 200—250 мл мочи), хлороформом (1—2 капли).

Самым нейтральным консервантом считают толуол; хлороформ же растворяет жиры и затрудняет определение сахара; с тимолом трудно обнаружить белок.

Мочу для бактериологического исследования не консервируют.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МОЧИ

Суточное количество, относительная плотность, цвет, прозрачность, консистенция, запах мочи зависят от количества и состава корма, внешней температуры, приема воды, физической нагрузки, функции потовых желез, состояния сердца, кишечника и функционально-морфологического состояния мочевой системы (табл. 21, 25). При патологии могут наступать различные изменения в отделении мочи. Анурию (прекращение отделения мочи) и олигурию (уменьшение суточного количества) наблюдают при заболевании почек, сердца, при недостатке поступления жидкости в организм, образовании отеков, скоплении в организме экссудата, транссудата, обильном потении, рвоте, поносе, отравлении ртутью, свинцом, мышьяком. Анурия и олигурия указывают на глубокое поражение почек. Полиурию (увеличение количества мочи) отмечают при сахарном и несахарном диабете, при обильном введении жидкости в организм, в период исчезновения отеков, экссудатов, транссудатов, у истощенных животных — при недостатке в рационе белка, солей, иногда при острой и хронической почечной недостаточности. Ишурия (невозможность мочеиспускания) бывает при закупорке мочеиспускательного канала камнями, рубцовыми стягиваниями, опухолями. Среди других изменений мочеотделения могут быть поллакиурия (частое мочеиспускание), олигакиурия (выделение мочи через продолжительные отрезки времени), дизурия (затрудненное, болезненное мочеиспускание), никтурия (выделение ночью большего количества мочи, чем днем).

Относительная плотность (удельный вес) мочи зависит от концентрации кристаллических веществ и показывает соотношение их с водой. По изменению относительной плотности можно судить о концентрационной способности почек.

24. Среднее количество мочи, выделяемое различными видами животных в течение суток

Вид животных	Количество мочи, л	Вид животных	Количество мочи, л
Лошадь	3—10	Свинья	2,0—4,0
Крупный рогатый скот	6—12	Собака	0,21—2,0
Овца, коза	0,5—1,5	Кролик	0,02—0,05
Верблюд	8—15	Кошка	0,1—0,2

25. Относительная плотность мочи здорового животного при обычном рационе г/мл, кг/л)

Вид животных	Относительная плотность мочи	Вид животных	Относительная плотность мочи
Лошадь	1,020—1,050	Кошка	1,02—1,00
Крупный рогатый скот	1,015—1,045	Кролик	1,01—1,00
Мелкий рогатый скот	1,015—1,065	Собака	1,02—1,00
Свинья	1,010—1,030	Верблюд	1,030—1,00

Измеряют относительную плотность урометром, который осторожно опускают в цилиндр с размешанной мочой. Показатели плотности определяют по нижнему мениску мочи. Для менее концентрированной мочи применяют урометр с делениями от 1,000 до 1,030, для концентрированной — от 1,000 до 1,060. Точные показания урометра отмечаются при температуре мочи 15°С (указывается на урометре). Если температура мочи отличается от указанной, то на каждые 3°С повышения или понижения температуры к показателю урометра добавляют или вычитают 0,001 величины установленной относительной плотности. Повышение относительной плотности характерно для сахарного диабета, инфекционных и лихорадочных заболеваний, сопровождающихся олигурией, поносами, сильной рвотой и потением, а понижается она при полиурии, ацетонемии крупного рогатого скота, сморщенной почке, а также при ослаблении концентрационной способности почек.

Цвет мочи. У здоровых животных цвет мочи обусловлен концентрацией растворенных в ней веществ и пигментов, выделяемых почками. У лошадей моча от бледно- до буро-желтого цвета; у жвачных от светло-желтого до светло-коричневого; у свиней светло-желтая; у собак и кошек светло-желтая или желтая. Моча темнеет при ее хранении. Изменяется цвет мочи при различных патологических состояниях и часто зависит от присутствия в ней крови, гемоглобина и продуктов его распада. Присутствие крови в моче придает ей красноватую окраску (в зависимости от силы кровотечения); гемоглобина — красно-коричневую; метгемоглобина — черную. При большом содержании индикана моча темно-коричневая; при желтухе — желтая с зеленоватым оттенком; при гемоглобинурии — от светло-красного до темно-вишневого или темно-бурого цвета. При некоторых инвазионных и инфекционных заболеваниях моча красно-желтая. После центрифугирования и отстаивания в моче образуется рыхлый бурый осадок. Цвет мочи зависит от некоторых лекарственных веществ и корма. При употреблении дегтя, феноловмоча от темной до темно-зеленой окраски; препараты карболовой кислоты изменяют ее цвет до коричневого или черного, метиленовая синька — до зеленовато-синего. От амидопирина, фенотиазина, сульфантрола, а также от красной свеклы она приобретает цвет от желтого до ярко-красного.

Прозрачность. Устанавливают ее в прозрачной стеклянной посуде при дневном свете одновременно с определением цвета мочи. У всех животных, кроме однокопытных, свежевыпущенная моча чистая, прозрачная, без осадка. Через несколько часов в моче образуется помутнение в виде облачка, состоящее из мукоида — слизи из мочевыводящих путей и щелочных фосфатов. У здоровых лошадей из-за содержания одноосновной углекальциевой соли и фосфатов моча мутная. При аммиачном брожении в результате разложения углекальциевой соли с образованием углекислого нерастворимого кальция поверхность мочи покрывается тонкой пленкой. Мутная моча у других видов животных указывает на патологию в мочеточниках, мочевом пузыре, почках, и при исследовании осадка в нем обычно находят эпителиальные клетки, слизь, капельки жира, форменные элементы крови и другие включения.

Консистенцию определяют переливанием мочи из сосуда в сосуд. У домашних животных (кроме однокопытных) моча жидкая и водянистая. У однокопытных она слизистая из-за содержания муцина и при переливании тянется нитями. Жидкая моча у лошадей бывает при полиурии. При патологии в мочевых путях, уменьшении диуреза моча становится вязкой или желеобразной.

Запах свежей мочи специфичен для каждого вида животных. На запах мочи влияет концентрация в ней летучих жирных кислот. Характерный запах бывает при даче внутрь скипидара, тимола, камфоры, эфирных масел, при ацетонемии крупного рогатого скота и сахарном диабете у собак. Фруктовый запах отмечают при кетозе у коров и кетонурии у овец, аммиачный — при уроцистите, параличе мочевого пузыря, указывая на аммиачное брожение мочи в мочевом пузыре.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕАКЦИИ МОЧИ (pH)

У плотоядных животных моча кислая, у травоядных — щелочная или нейтральная, у всеядных — щелочная или кислая. Реакция мочи во многом зависит от состава корма. От большого содержания в кормах белка или при голодании реакция кислая, от растительного корма — щелочная. Для определения величины

pH используют pH-метр. pH мочи у лошади 7,1—8,7, у крупного рогатого скота 7—8,6, у молочных телят — ближе к кислой, у плотоядных — 5,7—7, у свиней — 6,5—7,8, у коз — 8—8,5. Часто pH устанавливают с помощью индикаторной бумаги, которую опускают в мочу. Изменившийся цвет бумаги сравнивают с цветной шкалой, снабженной цифровыми обозначениями величины pH. Нейтральная моча не меняет цвет лакмусовой бумаги.

При ацидозе в моче может увеличиваться количество хлоридов, уменьшаться — натрия, калия и др. При алкалозе возможны аммиачное брожение мочевины в мочевом пузыре с образованием углекислого аммония, снижение содержания хлоридов, увеличение катионов Na^+, K^+ и др.

МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ БЕЛКА В МОЧЕ

Принцип методов. Все реакции на содержание белка в моче основаны на его денатурации и осаждении. Обязательное условие для анализа — предварительное фильтрование и подкисление щелочной мочи. Для обнаружения белка в моче применяют пробы кипячением, с сульфосалициловой кислотой и др.

Проба кипячением. Профильтрованную мочу щелочной реакции подкисляют, внося несколько капель (2—3) 5—10%-ного раствора уксусной кислоты до слабокислой реакции. Избыток уксусной кислоты вызывает образование растворимых ацидальбуминов, что обусловливает исчезновение положительной реакции при наличии белка в моче. Если после фильтрования моча остается мутной, добавляют тальк или жженую магнезию (около чайной ложки на 100 мл мочи), взбалтывают и вновь фильтруют. Реакцию ставят в двух пробирках, одна из которых служит контролем. После кипячения пробы результат оценивают на черном фоне при проходящем свете. При наличии белка моча мутнеет.

Проба с сульфасалициловой кислотой. *Реактивы.* Обычно используют 20%-ную сульфасалициловую кислоту. Готовят ее следующим образом: к 26 г салициловой кислоты добавляют 18—20 мл концентрированной серной кислоты и постепенно нагревают до 95—100°С. Содержимое переходит в кристаллическую массу сульфосалициловой кислоты. После охлаждения содержимое колбы разбавляют дистиллированной водой до 150 мл.

Ход определения. В пробирку с 3—4 мл мочи вносят 5—6 капель 20%-ной сульфасалициловой кислоты. При наличии белка после добавления реактива появляются хлопья. Это одна из наиболее чувствительных проб мочи, позволяющая установить наличие 0,015‰ белка (то есть 0,015 г на 1000 мл мочи). Можно использовать также сухой реактив, для чего к 3—5 мл мочи добавляют несколько кристаллов сульфасалициловой кислоты или вносят в нее фильтровальную бумажку, пропитанную раствором сульфасалициловой кислоты.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА В МОЧЕ

Метод Брандберга — Робертса — Стольникова. *Принцип.* В основе метода лежит проба Геллера с использованием 50%-ной азотной кислоты.

Реактив. 50%-ный раствор азотной кислоты.

Ход определения. К 1—2 мл профильтрованной мочи по стенке пробирки наслаивают 50%-ный раствор азотной кислоты. При постановке реакции обращают внимание на плотность, ширину и время появления белого кольца на границе разделения сред. Появление белого нитевидного кольца на 3-й минуте после наслоения 50%-ной азотной кислоты на мочу соответствует 0,033% белка в моче. Если нитевидное кольцо образуется тотчас после наслоения реактива, мочу разводят вдвое дистиллированной водой или изотоническим раствором натрия хлорида. При возникновении широкого кольца делают четырехкратное разведение (1 часть мочи на 3 части дистиллированной воды или изотонического раствора натрия хлорида), а при необходимости — восьмикратное разведение (и т. д.). В разведенной моче снова уточняют время появления кольца. Полученное разведение умножают на 0,033‰, и это произведение отражает количественное содержание белка в моче. Например, слабое белое нитевидное кольцо появилось в течение 3 мин в разведенной стократно моче. Количество белка будет $0{,}033‰ \cdot 100 = 3{,}3‰$. Удобно пользоваться таблицей 26.

Количество белка в моче при различных ее разведениях

Моча	Вода	Степень разведения	Количество белка в моче, ‰	Моча	Вода	Степень разведения	Количество белка в моче, ‰
1 часть	1 часть	2	0,066	1 часть	8 частей	9	0,297
То же	2 части	3	0,099	—»—	9 —»—	10	0,33
—»—	3 —»—	4	0,132	—»—	19 —»—	20	0,66
—»—	4 —»—	5	0,165	—»—	29 —»—	30	0,99
—»—	5 —»—	6	0,198	—»—	39 —»—	40	1,32
—»—	6 —»—	7	0,231	—»—	99 —»—	100	3,30
—»—	7 —»—	8	0,244	—»—	999 —»—	1000	33,0(3,3%)

Например, при наслаивании неразведенной мочи на 50%-ную азотную кислоту быстро образовалось плотное белое кольцо. В градуированную пробирку вносят 7 мл растворителя и 1 мл исследуемой мочи. 1 мл разведенной восьмикратно мочи наслаивают на 50%-ную азотную кислоту. Если кольцо появляется сразу, берут 1 мл восьмикратно разведенной мочи, добавляют 1 мл растворителя и получают 16-кратное разведение. 1 мл разведенной мочи наслаивают на реактив и, если нитевидное белое кольцо появится на 3-й минуте, делают расчет: 0,033‰·16=0,528, или 0,53‰ белка и т. д. Если реакция с сульфасалициловой кислотой положительная, а при количественном способе белок в моче не определяется, то считают, что в ней имеются лишь следы белка.

Этот метод количественного определения белка в моче получил широкое распространение благодаря своей точности и простоте постановки.

Клиническое значение. У здоровых животных белка в моче содержится незначительное количество и обычными лабораторными методами его не обнаруживают. Появление белка в моче — альбуминурия (вернее, протеинурия, так как в составе белка мочи имеются также α_1- и α_2-глобулины) может быть почечного (ренального) или внепочечного (экстраренального) происхождения, причем ренальная протеинурия может быть функциональной и органической природы. Физиологическая протеинурия обычно кратковременна и проявляется после чрезмерного скармливания нативного яичного белка (производителям, молодняку при диарее), физического переутомления, переохлаждения, перегревания, при беременности (особенно в последние недели перед родами), стрессах, ушибах почек, а также у новорожденных в первые часы жизни, когда содержание белка в моче повышается до 0,1—0,4‰. Органические (истинные, ренальные) протеинурии отмечают при нефрите, нефрозе и нефросклерозе и носят стойкий характер, указывая на органическое поражение почек. Содержание белка достигает 10—20‰ (иногда свыше 30‰). Протеинурия наиболее высока при липоидном и амилоидном нефрозах. При остром и хроническом нефритах содержание белка в моче не превышает 10‰. Альбуминурию органического происхождения наблюдают при врожденных аномалиях почек (поликистоз), ожогах, желтухе, инвагинации и перекручивании кишечника, тиреотоксикозе, лихорадках и отравлении солями тяжелых металлов. Постренальная (ложная) альбуминурия развивается из-за примеси к моче выделений мочеполовых органов (сперма, лейкоциты, эпителий и т. п.). Преренальная (застойная) альбуминурия бывает при декомпенсации гемоциркуляции.

МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ САХАРА В МОЧЕ

Проба Гайнеса. Принцип метода основан на способности глюкозы восстанавливать в щелочной среде гидрат окиси меди в гидрат закиси меди (желтый цвет) или закись меди (красный цвет).

Реактивы. А. 13,3 г кристаллического (х.ч. или ч.д.а.) меди сульфата растворяют в 400 мл дистиллированной воды. Б. 50 г калия едкого растворяют в 400 мл

дистиллированной воды. В. 15 г глицерина (х.ч. или ч.д.а.) растворяют в 200 мл дистиллированной воды. Растворы А и Б смешивают и тотчас добавляют раствор В. Реактив длительно сохраняется в холодильнике.

Ход определения. К 3—4 мл полученного реактива добавляют 8—12 капель мочи, кипятят на пламени или ставят в кипящую водяную баню. При наличии сахара в моче образуются желтая или красная окраска жидкости и осадок.

Метод Ниляндера. *Принцип* метода основан на свойстве глюкозы восстанавливать висмута нитрат в металлическую форму.

Реактив. Берут 2 г висмута нитрата и в ступке растирают с 4 г сегнетовой соли, после чего растворяют в 100 мл 10%-ного раствора натра едкого и фильтруют. Реактив бесцветный, хранят в темной посуде в холодильнике.

Ход определения. Пробу мочи смешивают в соотношении 2 : 1 с полученным реактивом и кипятят 3 мин. При наличии сахара моча окрашивается от коричневого до черного цвета и при отстаивании образуется темный осадок. Эта проба чаще других дает положительный результат при отсутствии сахара в моче из-за наличия в нормальной и патологической моче других участвующих в реакции веществ (белок, мочевая кислота, пигменты, соединения глюкуроновой кислоты, антипирин, салициловая кислота, биомицин, тетрациклин и др.).

Метод индикаторных бумажек. В мочу опускают полоску фильтровальной бумаги, предварительно пропитанной специальным реактивом (глюкотест). При наличии в моче сахара бумага окрашивается в синий цвет. Сравнивая интенсивность окраски индикаторной бумажки с прилагаемым к набору цветным стандартом, определяют ориентировочное количество сахара в моче. При сомнительной реакции на глюкотест проводят качественные реакции с разными реактивами по описанным выше методам.

Определение сахара в моче поляриметрическим методом. *Принцип.* Глюкоза обладает способностью вращать оптическую плоскость поляризации вправо. По величине этого смещения можно судить о концентрации глюкозы в моче.

Прибор. Поляриметр оптический.

Ход определения. Моча должна быть прозрачной, свободной от белка и иметь кислый pH, для чего ее подкисляют слабой уксусной кислотой, кипятят, охлаждают и фильтруют. Если моча мутная и в ней много пигментов, применяют адсорбенты (ацетат свинца, активированный уголь и др.). В колбу на 50 мл вносят адсорбент, наливают мочу, взбалтывают и фильтруют. Трубку поляриметра заполняют профильтрованной мочой (без наличия воздушных пузырьков), накрывают шлифованным стеклом, плотно завинчивают, протирают и помещают в поляриметр. По изменению цвета определяют угол отклонения луча в градусах шкалы поляриметра, на котором угол отклонения на 1° соответствует 1% глюкозы. При длине трубки 18,94 см величина угла отклонения соответствует показателю концентрации глюкозы, при длине 9,47 см показатель умножают на 2, а при длине 4,73 — на 4.

При пользовании поляриметром надо учитывать следующее: а) концентрацию сахара устанавливают через 2—3 мин после заполнения трубки и зарядки аппарата, так как колебания жидкости мешают измерениям; б) заполненная трубка не должна длительно стоять, иначе проба помутнеет; в) после окончания измерений трубку и стекла промывают дистиллированной водой и просушивают. Нельзя пользоваться водопроводной водой, так как от нее стекла мутнеют.

Клиническое значение. В моче здоровых животных глюкоза не содержится, при нормальной функции почек глюкозурия возникает, если концентрация глюкозы в крови становится выше сахарного порога почек. Почечный порог сахара повышается при снижении клубочковой фильтрации, после введения вазопрессина (питуитрина), адреналина, паратгормона. Понижение почечного порога сахара (глюкозурия) наблюдают при снижении реабсорбции в почечных канальцах, когда его уровень в крови бывает даже нормальным.

Почечную глюкозурию часто отмечают при беременности, острой почечной недостаточности, хроническом нефрите, нефрозе, интоксикации. Глюкозурия встречается при стрессовом состоянии, поражении центральной нервной системы, гипертиреоидизме, опухолях надпочечников, гиперфункции гипофиза. Алиментарная гипергликемия и глюкозурия развиваются при перегрузке легкопереваримыми углеводами. Наиболее характерно протекает глюкозурия при сахарном диабете (сахарном мочеизнурении).

ОБНАРУЖЕНИЕ КЕТОНОВЫХ (АЦЕТОНОВЫХ) ТЕЛ В МОЧЕ

Проба Ланге. *Принцип* метода основан на свойстве натрия нитропруссида в щелочной среде в присутствии ацетоновых тел давать интенсивное вишнево-красное или фиолетовое окрашивание.

Реактивы. 1. Ледяная уксусная кислота.

2. Свежий 5%-ный раствор натрия нитропруссида.

3. Концентрированный раствор аммиака (≈25%-ный).

Ход определения. К 3—5 мл исследуемой мочи добавляют около 1 мл ледяной уксусной кислоты и около 0,5—1 мл свежеприготовленного 5%-ного раствора натрия нитропруссида, перемешивают, а затем наслаивают из пипетки 2—3 мл концентрированного аммиака. При наличии ацетоновых тел в моче в течение 3 мин на границе двух сред образуется розово-фиолетовое кольцо. Более интенсивная окраска появляется в присутствии ацетоуксусной кислоты, а слабая окраска обусловливается наличием ацетона.

Проба Лестраде. *Принцип* метода тот же, что и в пробе Ланге.

Реактивы готовят по следующей прописи: натрия нитропруссида — 1 г, натрия углекислого безводного — 20 г, аммония сульфата — 20 г (1 : 20 : 20). Реактивы смешивают и растирают в ступке до получения мелкого однородного порошка, который затем хранят в темной посуде с плотно притертой пробкой.

Ход определения. На фильтровальную бумагу на кончике скальпеля помещают небольшое количество порошка реактивов и вносят пипеткой несколько (1—3) капель мочи. При наличии в моче ацетоновых тел на месте нанесения реактива и мочи на бумагу через 40—60 с образуется окрашивание от розового до темно-фиолетового. Чувствительность пробы по ацетону и ацетоуксусной кислоте — 10 мг% и выше.

Клиническое значение. Кетоновые (ацетоновые) тела состоят из ацетона, ацетоуксусной и β-оксимасляной кислот. Так как в моче они бывают обычно все вместе, раздельное их определение клинического значения практически не имеет. У кетоновых тел нет пороговой концентрации, в небольшом количестве их находят у здоровых животных. Ацетонурия связана прежде всего с недостаточной обеспеченностью организма энергией (глюкозой), что бывает при белковом, жировом перекорме, ожирении, недостатке легкопереваримых углеводов в рационе, истощении и кахексии, нарушениях эндокринной регуляции метаболизма (сахарный диабет), при поражении желез внутренней секреции, гиперкортикоидизме, тиреотоксикозе.

ОБНАРУЖЕНИЕ ЖЕЛЧНЫХ ПИГМЕНТОВ

Принцип метода основан на свойстве билирубина окисляться в биливердин в присутствии окислителей (йод, азотная, трихлоруксусная кислоты и др.).

Проба Розина. *Реактивы.* 1. Раствор Люголя (1 г йода и 2 г калия йодистого растворяют в 300 мл дистиллированной воды).

2. 1%-ный спиртовой раствор йода.

Ход определения. К 4—5 мл мочи наслаивают раствор Люголя или 1%-ный спиртовой раствор йода. При наличии в моче билирубина на границе двух сред образуется зеленое кольцо.

Проба Фуше. *Принцип* метода основан на окислении билирубина железом хлорным, входящим в состав реактива Фуше, после осаждения бария хлоридом.

Реактивы. 1. 15%-ный раствор бария хлорида.

2. Реактив Фуше (100 мл 25%-ного раствора трихлоруксусной кислоты и 10 мл 10%-ного раствора железа полуторахлористого).

Ход определения. К 10—12 мл исследуемой мочи добавляют половину объема 15%-ного раствора бария хлорида, перемешивают. Бария хлорид осаждает билирубин. Содержимое пробирки фильтруют. На извлеченный из воронки фильтр (предварительно его расправляют на сухой фильтровальной бумаге) наносят 2—3 капли реактива Фуше. При наличии в моче билирубина на фильтре появляется зелено-синее или голубоватое окрашивание. Эта проба одна из наиболее чувствительных и применяется в случаях, когда получены неясные или сомнительные результаты с другими реактивами.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИЛИРУБИНА В МОЧЕ ПО ЙЕНДРАШЕКУ — ГРОФУ В МОДИФИКАЦИИ ВИТА

Принцип метода состоит в том, что билирубин, извлекаемый из осадка (фосфорнокислого кальция) спиртом и диазосмесью, образует азобилирубин.

Реактивы. 1. 11%-ный раствор кристаллического натрия фосфорнокислого двузамещенного.

2. 20%-ный раствор кристаллического кальция хлористого.

3. 0,2%-ный раствор кристаллического кальция хлористого.

4. 96%-ный этиловый спирт.

5. Диазореактивы № 1 и № 2. Диазореактив № 1 состоит из 5 г сульфаниловой кислоты, растворенной в небольшом количестве воды, к которой добавляют 15 мл концентрированной соляной кислоты и смесь доливают водой до объема 1000 мл. Диазореактив № 2 состоит из 0,5%-ного раствора натрия азотнокислого; рабочий раствор готовят перед его использованием: берут 10 мл диазореактива № 1 и 0,5 мл — диазореактива № 2.

6. Концентрированная соляная кислота.

Ход определения. Определяют pH мочи (лакмусовой полоской). Очень кислую мочу нейтрализуют несколькими каплями крепкой щелочи, взбалтывают и в центрифужную градуированную пробирку вносят 2 мл; добавляют 1,5 мл раствора натрия фосфорнокислого и 0,5 мл 20%-ного раствора $CaCl_2$. Смесь отстаивают 10—15 мин и центрифугируют 15 мин при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость сливают, осадок дважды промывают 0,2%-ным раствором кальция кристаллического, внося по 10 мл каждый раз. К отмытому осадку добавляют 6 мл спирта и 1 мл рабочей диазосмеси, отстаивают 10 мин и добавляют 2 мл HCl. Смесь доливают спиртом до 10 мл и колориметрируют при зеленом светофильтре в кювете 1 см. Контролем во второй кювете служит дистиллированная вода. Расчет ведут по формуле: X мг% $= 3{,}46 \cdot a$, где a — величина экстинкции при толщине слоя 1 см; 3,46 — фактор пересчета.

Клиническое значение. В моче здоровых животных желчные пигменты (билирубин, биливердин) обычными методами лабораторного исследования не выявляют. Билирубинурия возникает при ретенции желчных пигментов до уровня, превышающего их почечный порог (более 2 мг%). Обычно гипербилирубинемию и билирубинурию наблюдают при тяжелом поражении печени и желчных путей (паренхиматозная и механическая желтухи). Моча и ее пена приобретают темный желто-зеленый оттенок. С мочой выделяется только прямой билирубин. Непрямой билирубин — даже при высоком содержании его в крови — с мочой не выделяется, так как связан с белками сыворотки крови. Обнаружение желчных пигментов таким образом может служить диагностическим тестом при дифференциации паренхиматозной и механической желтух от гемолитической, при которой возрастает содержание стеркобилина и уробилина (табл. 27).

27. Дифференциация желтух по наличию желчных пигментов

Показатель	Вид желтухи			
	механическая		паренхиматозная	гемолитическая
	неполная закупорка	полная закупорка		
Билирубин в сыворотке крови	Прямая	Прямая	Прямая	Прямая
Билирубин в моче	+	++	+	—
Уробилин в моче	—	—	+	+
Стеркобилин в кале	+	—	+	++
Желчные кислоты в моче	+	+	+	—
Функциональные нарушения печени	—	—	+	—

ОБНАРУЖЕНИЕ УРОБИЛИНОВЫХ ТЕЛ (УРОБИЛИНОГЕНА И УРОБИЛИНА) В МОЧЕ

Проба Флоренса. *Принцип.* Для определения уробилиновых тел в моче из нее предварительно удаляют билирубин и гемоглобин (при их наличии), для чего к 8 мл исследуемой мочи добавляют 2 мл 10%-ного раствора кальция хлористого (или бария хлористого) и несколько капель крепкого раствора аммиака до щелочной реакции. Полученную смесь фильтруют и в фильтрате определяют уробилин.

Реактивы. 1. Концентрированная серная кислота.

2. Этиловый спирт.

3. Концентрированная соляная кислота.

Ход определения. 8—10 мл мочи подкисляют несколькими каплями концентрированной серной кислоты, взбалтывают и добавляют несколько мл этилового спирта. Пробирку плотно закрывают пробкой и осторожно смешивают жидкости, катая пробирку в ладонях или по столу. В другую пробирку вносят 2—3 мл концентрированной соляной кислоты. Из первой пробирки пипеткой отсасывают эфирный слой и наслаивают его на соляную кислоту во второй пробирке. На границе двух жидкостей в присутствии уробилина образуется розовое кольцо, интенсивность окрашивания пропорциональна содержанию уробилина в моче.

Проба Богомолова. *Реактивы.* 1. 10%-ный раствор медного купороса.

2. Хлороформ.

3. Соляная кислота.

Ход определения. К 8—10 мл профильтрованной мочи добавляют 10 капель 10%-ного раствора медного купороса и 1—1,5 мл хлороформа (если после внесения раствора медного купороса появляется помутнение вследствие образования гидроокиси меди, добавляют несколько капель соляной кислоты до просветления раствора). Если после перемешивания раствора в осадке образуется розово-красное окрашивание, это свидетельствует об уробилинурии.

Клиническое значение. Уробилиновые тела являются дериватами билирубина. Уробилин — нормальное включение мочи, образующееся в кишечнике при восстановлении билирубина. Будучи нестойким соединением, он легко окисляется в уробилин, содержание которого в моче достигает 0,5—1,5 мг%. Увеличение его концентрации в моче — признак нарушения печеночной функции (цирроз, гепатит). Отсутствие уробилина в моче при наличии желчных пигментов — показатель нарушения секреции желчи в кишечник при механической (обтурационной) желтухе.

Уробилинурия связана с увеличением распада эритроцитов и гемоглобина (гемолиз, кровоизлияния, сердечно-сосудистые заболевания, застой крови в печени и т. д.). Содержание стеркобилина при этом также возрастает. Уробилинурию отмечают также при энтероколитах, завороте кишок, их инвагинации и обтурации. Усиленное образование уробилиногена связано с резким нарастанием гнилостных процессов и повышением резорбции из кишечника в кровь стеркобилиногена. Длительное отсутствие его в моче при одновременном увеличении билирубина свидетельствует о неблагоприятном течении болезни (переход хронического гепатита в цирроз, обтурационные желтухи вследствие злокачественных новообразований). Появление уробилина в моче при механической желтухе — хороший прогностический признак.

ОБНАРУЖЕНИЕ КРОВИ И КРОВЯНЫХ ПИГМЕНТОВ В МОЧЕ

Проба с гваяколовой смолой. *Принцип.* Все химические пробы на гематурии сводятся к обнаружению кровяного пигмента путем гемолиза эритроцитов и освобождения из них гемоглобина, который способен отнимать водород от амидопирина, гваяколовой смолы, бензидина и других органических соединений и переносить его на перекись водорода с образованием окрашенных соединений. Чувствительность качественных проб возрастает после извлечения кровяного пигмента

из мочи эфиром. Для приготовления эфирной вытяжки берут 10—15 мл нативной, перемешанной мочи, добавляют 2 мл ледяной уксусной кислоты, 8 мл этилового эфира и 1 каплю этилового спирта, взбалтывают и дают постоять.

Реактивы. 1. Этиловый эфир.

2. Свежеприготовленный насыщенный раствор гваяколовой смолы в этиловом спирте.

3. Перекись водорода.

Ход определения. К 2 мл эфирной вытяжки мочи добавляют 6 капель спиртового свежеприготовленного насыщенного раствора гваяколовой смолы и 8 капель свежей перекиси водорода. При положительной реакции через 5—8 мин появляется синее окрашивание.

Проба с бензидином. *Принцип* метода тот же, что и в предыдущем методе.

Реактивы. 1. Этиловый эфир.

2. 5%-ный раствор бензидина в ледяной уксусной кислоте.

3. Свежая перекись водорода.

Ход определения. К 2 мл эфирной вытяжки мочи добавляют 5 капель 5%-ного раствора бензидина в ледяной уксусной кислоте и 8—10 капель перекиси водорода. При наличии крови в моче образуется зеленое окрашивание раствора, однако эта реакция не является специфичной только для гематурии. Количественные методы определения крови в моче практического значения не имеют.

Клиническое значение. В моче здоровых животных встречаются лишь единичные эритроциты и лейкоциты (0—5 эритроцитов и 0—2 лейкоцита в 1 мкл), что выявляют цитологическими методами. Кровь в моче можно обнаружить также спектроскопическими, микроскопическими и химическими методами. Гематурию, эритроцитурию (эритрурия) и гемоглобинурию чаще наблюдают при патологическом состоянии (истинной гематурии) или они могут быть ложными.

Истинные гематурии бывают ренальными (почечными), постренальными (внепочечными) и смешанными, встречаются при застое крови в почках, нефритах, нефрозах, причем наличие белка в моче свыше 1% и эритроцитов подтверждает ренальное их происхождение. Они бывают при сепсисе, тромбозе почечных вен и др. Функциональные почечные гематурии являются следствием увеличения проницаемости почечного фильтра (перегревание, сотрясения, токсикоинфекции, лекарственная гематурия). Постренальные гематурии возникают при воспалении и травмах мочеотводящих путей (пиелит, пиелоцистит, мочекаменная болезнь, опухоли). Смешанные гематурии отмечают при геморрагических диатезах (гипо- и авитаминоз С, анемия). Ложные гематурии — результат примеси крови из половых органов. Гемоглобинурия бывает первичной (идиопатической) и вторичной (симптоматической). Она может возникнуть при гемолизе эритроцитов и высокой гемоглобинурии. Моча, содержащая гемоглобин, имеет темно-красный цвет, а в ее осадке эритроцитов нет. Идиопатическая гемоглобинурия отмечается при переохлаждении, перенапряжении (паралитическая миоглобинурия лошадей), перегреваниях. Гемосидеринурия обычно является следствием хронических гемолитических анемий, эритробластозов и гемохроматозов. Если гематурия определяется микроскопически, то специальные исследования на гематурию не обязательны, а при подозрении на гематурию проводят химический анализ и микроскопию мочевого центрифугата.

Проба на миоглобин. *Принцип* метода основан на осаждении аммония сульфатом гемоглобина и способности миоглобина при этом окрашиваться в красно-коричневый цвет.

Реактив. Аммония сульфат кристаллический.

Ход определения. К 5 мл исследуемой мочи добавляют 2,8 г кристаллического аммония сульфата и фильтруют. Если фильтрат имеет красно-коричневый цвет, то в моче содержится миоглобин (миоглобинурия); если цвет фильтрата нормальный, то в моче присутствовал гемоглобин, около 80% которого осадил реактив.

Клиническое значение. Повышенное содержание миоглобина в моче характерно для паралитической миоглобинурии лошадей, отмечают также при электротравмах, механических травмах мышц, тяжелом миозите.

Пробы на индикан. 1. Проба Яффе.

Принцип. При действии на мочу концентрированной серной кислотой индоксилсерная кислота гидролизуется в индоксил, который при добавлении хлороформа и нескольких капель раствора калия перманганата окисляется в синее

индиго. Интенсивность окраски хлороформа синим индиго зависит от концентрации индикана в моче.

Реактивы. 1. Концентрированная серная кислота.

2. Хлороформ.

3. 2%-ный раствор калия перманганата.

4. Гипосульфит кристаллический.

Ход определения. К 8—10 мл мочи добавляют равный объем концентрированной серной кислоты, 1—2 мл хлороформа и 1—2 капли 2%-ного раствора калия перманганата. Пробирку плотно закрывают пробкой и многократно опрокидывают, не взбалтывая содержимого. В присутствии индикана хлороформ окрашивается в голубой, синий или розовый цвет. При наличии в моче йодистых солей также образуется розовое окрашивание, которое исчезает после добавления кристаллика гипосульфита, что и используется для дифференциации индикана от йодидов. Интенсивность окраски выражают крестами: резко положительная реакция (++++) имеет фиолетовую окраску, положительная (+++) — резко-синюю и синюю (++), а слабоположительная (+) — бледно-синюю.

Проба Обермейера.

Принцип метода тот же, что и в пробе Яффе.

Реактивы. 1. Смесь, состоящая из 0,2—0,4 г железа хлорного и 100 мл концентрированной соляной кислоты. 2. Хлороформ.

Ход определения. К 10 мл мочи добавляют равное количество реактива, состоящего из 0,2—0,4 г железа хлорного и 100 мл концентрированной соляной кислоты (реактив нестоек), вносят 1—2 мл хлороформа и несколько раз опрокидывают пробирку. Синее окрашивание хлороформа указывает на наличие в моче индикана.

Клиническое значение. Индикан представляет собой калиевую или натриевую соль индоксилсерной кислоты и является постоянной составной частью нормальной мочи. Образуется он в тонком отделе кишечника при гниении белков, содержащих триптофан (индоламинопропионовую кислоту). Продукты этого расщепления (индол и скатол) ядовиты и окисляются в печени до эфира индоксила и индикана. Определение индикана основано на превращении его в индоксил после гидролиза эфирной связи минеральной кислотой и последующего окисления индоксила железом хлорным или калия перманганатом до синего или красного индиго. В моче здоровых животных индикан обычными качественными реакциями не выявляют. Индиканурию отмечают при усилении гнилостных процессов в кишечнике, длительных запорах, диспепсиях, наличии гнойных очагов в организме (абсцесс, эмпиема, гнилостный бронхит, опухоль), хронической почечной недостаточности. В моче лошадей содержание эфиросерных кислот (индикан, фенолы) может достигать 220 мг/л, крупного рогатого скота — 30 мг/л, кошек, кроликов, собак — 5—20 мг/л, фенола в моче лошадей и крупного рогатого скота может быть до 0,9—1,2 г/л.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО АЗОТА МОЧИ КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ С РЕАКТИВОМ НЕССЛЕРА

Принцип. Данный метод состоит из двух этапов: а) сжигания органических веществ мочи концентрированной серной кислотой; при этом азот в виде аммиака связывается серной кислотой с образованием аммония сернокислого; б) колориметрического определения количества аммиака, связывающегося с реактивом Несслера; при воздействии его на аммоний сернокислый интенсивность буровато-желтого окрашивания зависит от количества аммиака, а следовательно, и азота в моче.

Реактивы. 1. Концентрированная серная кислота.

2. Перекись водорода (пергидроль).

3. Реактив Несслера.

4. Стандартный раствор аммония сернокислого.

Оборудование. Горелка с асбестовой сеткой, ФЭК.

Ход определения. 1. Окисление по методу Кьельдаля. Мочу разводят в

10 раз и в колбу Кьельдаля вносят 1 мл разбавленной мочи, добавляют 1 мл концентрированной серной кислоты. Параллельно готовят холостую пробу с дистиллированной водой. Обе колбы 40 мин кипятят под тягой на асбестовой сетке, затем вносят по 1—2 капли пергидроля и продолжают сжигание, пока содержимое колб не станет бесцветным. После охлаждения в колбы вносят по 3 мл дистиллированной воды и сливают в мерные цилиндры. Колбы дважды смывают дистиллированной водой (по 3 мл), собирая смывы в соответствующие мерные цилиндры. Затем объем жидкости в мерных цилиндрах доводят до 10 мл и тщательно перемешивают стеклянной палочкой. Так получают минерализованную мочу, разведенную в 100 раз.

2. Колориметрирование. Пипеткой из каждого цилиндра берут по 1 мл минерализата и переносят в два других мерных цилиндра емкостью 25 мл, приливают по 13 мл дистиллированной воды и 1 мл реактива Несслера. В опытной пробе появляется желто-оранжевое окрашивание, плотность экстинкции которого измеряют на ФЭК при синем светофильтре.

3. Построение калибровочной кривой. Из основного стандартного раствора аммония сернокислого (х. ч. аммоний сернокислый, высушенный в эксикаторе до постоянной массы, растворяют в количестве 0,4716 г в 1 л дистиллированной воды; 1 мл раствора содержит 0,1 мг азота) готовят серию стандартных растворов с содержанием 0,01; 0,02; 0,04; 0,08; 0,12; 0,16 и 0,20 мг азота в 1 мл. К 1 мл каждого стандартного раствора в мерном цилиндре на 25 мл добавляют по 13 мл дистиллированной воды и по 1 мл реактива Несслера и колориметрируют. По показателям оптической плотности для каждого стандартного разведения известной концентрации строят калибровочный график, откладывая на оси ординат оптическую плотность по показаниям ФЭК, а на оси абсцисс — концентрацию азота в мг на 1 мл. Найденный показатель общего азота мочи умножают на 100 (степень разведения мочи).

Содержание общего азота в суточной моче (г) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{СВД}{1000},$$

где $С$ — содержание азота в 1 мл разведенной мочи; $В$ — разведение мочи (в 100 раз); $Д$ — суточный диурез; 1000 — коэффициент перевода в граммы (из мг).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АММИАКА В МОЧЕ ДИФФУЗИОННЫМ МЕТОДОМ (ПО КОНВЕЮ — БАЙРНУ)

Принцип. Свободный аммиак мочи вытесняется из нее щелочью и улавливается отмеренным количеством титрованной кислоты.

Реактивы и оборудование. 1. 0,02 н. раствор серной кислоты (0,01 моль/л).
2. Индикатор Таширо.
3. Насыщенный раствор калия углекислого.
4. 0,02 н. раствор едкой щелочи (0,02 моль/л).
5. Чашки Конвея.

Ход определения. В наружную камеру чашки Конвея вносят 0,5 мл профильтрованной мочи, а во внутреннюю камеру — 2 мл 0,02 н. раствора серной кислоты и 2 капли индикатора Таширо. Затем к моче в наружную камеру добавляют 2 мл насыщенного раствора калия углекислого, быстро и плотно закрывают чашку Конвея крышкой. Вращательными движениями добиваются тщательного перемешивания мочи с раствором калия углекислого. В контрольной чашке Конвея (контроль аммиака в воздухе) ставят холостой опыт с 0,5 мл воды вместо мочи. Перегонка аммиака ведется в изотермических условиях в течение 24 ч или в термостате при 37—40° в течение 1 ч. Затем крышки снимают и кислоту титруют из микробюретки 0,02 н. раствором щелочи до появления устойчивой зеленой окраски.

Содержание аммиака в суточном объеме мочи вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(v_1 - v_2) \cdot 0,34 \cdot Д}{0,5} \text{ мг},$$

где v_1 и v_2 — количество щелочи, пошедшее на титрование кислоты в контрольной (v_1) и исследуемой (v_2) пробах, мл; 0,34 — количество аммиака, соответствующее 1 мл раствора 0,02 н. серной кислоты, мг; $Д$ — количество выделенной за сутки мочи, мл; 0,5 — объем взятой для анализа мочи, мл.

Клиническое значение определения общего азота и его фракций в моче. Аминокислоты, не использованные для синтеза белка и образовавшиеся в результате его расщепления в организме, подвергаются распаду с образованием аммиака, углекислого газа и воды. Часть аммиака выделяется с мочой в виде соли аммония, но в основном он идет на синтез мочевины в печени, являющейся основным конечным продуктом обмена простых белков. Конечным продуктом распада сложных белков — нуклеопротеидов наряду с мочевиной является мочевая кислота.

Под общим азотом понимают сумму азотсодержащих веществ мочи (азот мочевины, мочевой кислоты, креатина, креатинина, аммонийных солей и др.). Известно, что 100 г белка содержат 16 г азота. Зная количество азота в моче, можно рассчитать количество распавшегося в организме белка. 80—90% выделяемого с мочой из организма азота составляет азот мочевины. Изменения в количественном и качественном составе азота мочи позволяют судить о белковом обмене в организме, функции печени, почек, где образуются азотистые вещества мочи.

В норме содержание мочевины в моче меняется в зависимости от состава и количества кормов. При безбелковой диете оно снижается. Повышенное выделение мочевины отмечают при усиленном распаде тканевых белков (лихорадка), тяжелом диабете. Патологическое снижение выделения мочевины возможно при циррозе печени, жировом ее перерождении, отравлениях. Отдельные порции мочи отличаются по содержанию мочевины, поэтому и определение надо проводить в средней пробе. Увеличивается количество аммиака в моче при циррозе печени, некоторых нарушениях обмена (сахарный диабет, кетоз, рвота, эксикоз, гипокалиемия, гипонатриемия и др.), а уменьшается при избыточном поступлении щелочи, нефрите.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ 17-КЕТОСТЕРОИДОВ В МОЧЕ (ПО КАЕН И САЛЬТЕРУ)

Принцип определения 17-кетостероидов в моче основан на их реакции с М-динитробензолом. При этом образуются продукты конденсации розово-фиолетового цвета. Интенсивность окраски реагирующей смеси пропорциональна концентрации 17-кетостероидов.

Реактивы. 1. Концентрированная соляная кислота.
2. Ледяная уксусная кислота.
3. Эфир.
4. 10%-ный раствор натра едкого.
5. 96%-ный этиловый спирт.
6. 2%-ный раствор М-динитробензола.
7. 3 н. спиртовый раствор калия едкого.

Оборудование. Эрленмейеровская колба; делительная воронка; водяная баня; ФЭК.

Ход определения. 1. Гидролиз глюкуронидов. В колбу Эрленмейера вносят 20 мл мочи, 3 мл концентрированной соляной кислоты и 1 мл ледяной уксусной кислоты, закрывают пробкой со стеклянной трубкой и на 15 мин ставят в кипящую водяную баню.

2. Экстракция 17-кетостероидов. По окончании гидролиза глюкуронидов колбу охлаждают водой из водопровода и содержимое ее дважды экстрагируют эфиром (по 10 мл), для чего гидролизат помещают в делительную воронку, добавляют 10 мл эфира и в течение 3 мин встряхивают. После расслоения нижний слой мочи сливают в стаканчик и используют для повторной экстракции эфиром. Эфирный экстракт (верхний слой) сливают в другой стаканчик, куда переливают и первый эфирный экстракт. Экстракт последовательно трижды промывают 10%-ным раствором натра едкого (по 10 мл), каждый раз взбалтывая в течение

3 мин, и один раз дистиллированной водой (10 мин). Нижний (водный) слой удаляют, а эфирный экстракт выпаривают в водяной бане при 70—80°С до получения сухого остатка, который затем растворяют в 2 мл 96%-ного этилового спирта и 1 мл переносят в другую пробирку. Одна пробирка служит опытной пробой, а другую обозначают буквой П (пигмент), так как дальнейшее окрашивание, образуемое 17-кетостероидами с М-динитробензолом, развивается на фоне окраски пигментов мочи. Обе пробирки выпаривают в кипящей водяной бане до образования сухого остатка.

3. Колориметрирование. В обе пробирки с сухими остатками вносят по 0,2 мл 96%-ного этилового спирта и по 0,2 мл 3 н. спиртового раствора калия едкого. В опытную пробирку вносят 0,2 мл 2%-ного раствора М-динитробензола. Затем готовят контрольные пробы, против которых определяют фотоэлектроколориметрическую плотность обеих проб. В контроль для опыта вносят 0,2 мл 96%-ного спирта, 0,2 мл 3 н. калия едкого и 0,2 мл 2%-ного раствора М-динитробензола. Контроль для «П» содержит 0,2 мл 96%-ного спирта и 0,2 мл 3 н. калия едкого. Все четыре пробирки на 1 ч ставят в темное место, затем добавляют по 5 мл 96%-ного этилового спирта и колориметрируют при зеленом светофильтре № 6.

4. Расчет производят по формуле:

$$C = \frac{(E_0 - E_к) \cdot Д \cdot 2}{k \cdot 20},$$

где C — концентрация 17-кетостероидов, мг/сут; E_0 — оптическая плотность опытной пробы; $E_к$ — оптическая плотность пробы «П»; $Д$ — суточный диурез, мл; $к$ — коэффициент поправки; 20 — количество мочи, взятое для анализа, мл; 2 — коэффициент перевода разведения к 1 мл.

Клиническое значение. Выделение 17-кетостероидов подчинено закономерностям полового цикла, что имеет клинико-диагностическое значение в гинекологии. Кроме того, их выделение с мочой возрастает при опухолях семенников, надпочечников, акромегалии, а снижается при заболеваниях гипофиза, недостаточной функции семенников.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХЛОРИДОВ В МОЧЕ ПО ФОЛЬГАРДУ

Принцип метода. Весь натрий хлористый мочи осаждается избытком серебра азотнокислого в виде нерастворимого серебра хлористого. Часть серебра азотнокислого, не вступившую в реакцию с хлоридами мочи, определяют титрованием раствором аммония роданистого. Интенсивный красный цвет, образующийся при соединении сернокислой окиси железа с аммонием роданистым, свидетельствует об окончании реакции.

Реактивы. 1. Титрованный 0,1 н. раствор серебра азотнокислого (16,994 г на 1 л дистиллированной воды).

2. Титрованный 0,1 н. раствор аммония роданистого. Для приготовления этого раствора 8 г аммония роданистого растворяют в 900 мл дистиллированной воды, а затем этим раствором титруют из бюретки смесь, состоящую из 20 мл титрованного раствора серебра азотнокислого и 5 мл раствора железоаммиачных квасцов, подкисленную азотной кислотой до обесцвечивания. Титрация проводится до появления слабого красноватого окрашивания всей жидкости. На осаждение 20 мл титрованного раствора серебра азотнокислого должно быть израсходовано 20 мл аммония роданистого. Если конечная реакция наступает раньше, то раствор аммония роданистого доливают водой до нужной концентрации и повторно титруют.

3. Насыщенный раствор квасцов железоаммиачных.

4. Разведенная азотная кислота (плотность 1,2).

Ход определения. В мерную колбу на 100 мл вливают 10 мл исследуемой мочи, подкисленной 2—5 каплями азотной кислоты, прибавляют 2 мл раствора

железоаммиачных. Моча лошади приобретает красно-бурую окраску, интенсивность которой необходимо ослабить прибавлением 10—15 капель раствора калия марганцовокислого. Если окрашивание не ослабевает, мочу подогревают на водяной бане.

Для осаждения всего хлора в виде нерастворимого серебра хлористого к подщелоченной моче приливают 15—20 мл титрованного раствора серебра азотнокислого и доливают дистиллированной водой до 100 мл. Содержимое закрытой колбы взбалтывают и после 5-минутного отстаивания фильтруют через сухой фильтр до тех пор, пока фильтрат не будет прозрачным. 50 мл такого фильтрата титруют аммонием роданистым до получения легкого красноватого окрашивания.

Расчет. Предположим, что на титрацию 50 мл фильтрата израсходовано 8 мл раствора аммония роданистого. Тогда на титрование фильтрата, содержащего полное количество взятой на анализ мочи, потребовалось бы 12 мл аммония роданистого. Так как 1 мл аммония роданистого соответствует 1 мл титрованного раствора серебра азотнокислого, очевидно, из 20 мл прибавленного к моче раствора серебра только 12 мл вступили в реакцию с аммонием роданистым, остальные 8 мл раствора серебра пошли на связывание натрия хлористого. Таким образом, содержание натрия хлористого можно определить по формуле:

$$\frac{0,1 \cdot 8 \cdot 100}{10} = 0,8\%.$$

В отличие от мочи лошадей мочу собак (чтобы избежать выпадения веществ, дающих осадок с серебром азотнокислым) обрабатывают несколько по-другому. Подкисленные 20 мл мочи разводят в 60 мл дистиллированной воды и прибавляют 5—8 г свободной от хлора цинковой пыли, 1,5 мл разведенной серной кислоты (1 : 5), затем нагревают в течение часа на водяной бане. Горячую жидкость фильтруют с повторным промыванием кипящей водой и, подкислив фильтрат соляной кислотой, определяют в обработанной моче содержание поваренной соли по способу Фольгарда.

Клиническое значение. Из организма большая часть хлоридов выделяется с мочой в виде натрия хлорида. Выделенное количество этого вещества зависит от многих причин: от содержания его в кормах, воде, выделительной способности почек, лихорадочных состояний, от различных заболеваний, связанных с развитием воспалительных отеков и скоплением в полостях экссудатов. Количественное определение хлоридов в моче имеет большое значение при отравлении животных поваренной солью.

В норме, по Френеру, за сутки натрия хлорида у лошади выделяется с мочой 25—35 г, у собаки — 0,25 — 5 г, а у других домашних животных — 0,6—0,9%.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛЬЦИЯ В МОЧЕ

Принцип метода заключается в осаждении кальция и обратном титровании раствором калия перманганата.

Реактивы. 1. Водный раствор аммиака.

2. 10%-ный раствор уксусной кислоты.

3. Насыщенный раствор аммония щавелевокислого.

4. Концентрированная серная кислота.

5. 0,1 н. раствор калия перманганата.

Ход определения. Для получения осадка к 100 мл свежей мочи прибавляют аммиак и ставят на 1—2 ч. Затем осадок переносят на фильтр в воронке и промывают подщелоченной аммиаком дистиллированной водой. Фильтр в воронке с промытым осадком оставляют в колбе и на фильтр выливают подогретый 10%-ный раствор уксусной кислоты. К полученному фильтрату добавляют насыщенный аммоний щавелевокислый; выпавший после этого осадок кальция щавелевокислого через 6—8 ч фильтруют. Осадок переносят на фильтр и несколько раз промывают 10%-ным раствором уксусной кислоты. Поместив

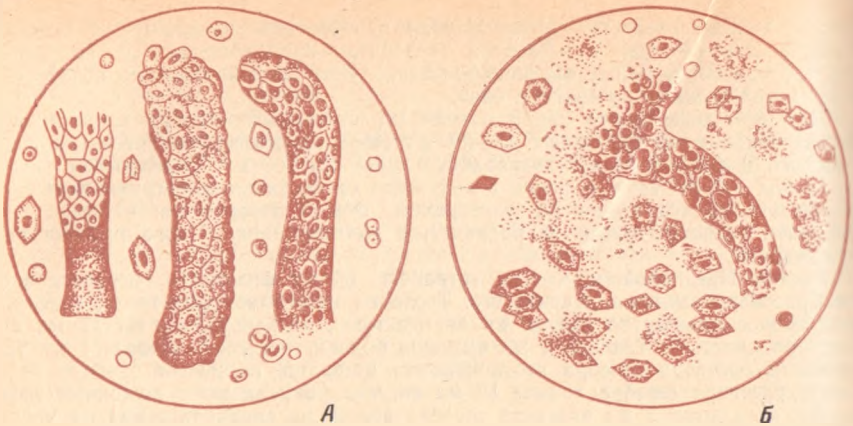


Рис. 5. Эпителиальные (*А*) и зернисто-эпителиальные цилиндры (*Б*).

воронку с фильтром в другую колбу, осадок смывают горячей дистиллированной водой в колбу через сделанное отверстие в фильтре. После этого добавляют в колбу 5 мл концентрированной серной кислоты и в горячем виде титруют 0,1 н. раствором, все время перемешивая раствор $KMnO_4$ до появления не исчезающей в течение 1—2 мин розовой окраски. 1 мл 0,1 н. раствора $KMnO_4$ соответствует 2 мг кальция.

Содержание кальция (мг%) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{100 \cdot 2 \cdot a}{вг},$$

где *а* — количество 0,1 н. раствора $KMnO_4$, пошедшего на титрование, мл; *в* — количество мочи, взятой для определения, мл; *г* — относительная плотность мочи.

Клиническое значение. Увеличивается количество кальция в моче при почечной гиперкальциурии, почечно-каменной болезни, наследственных аномалиях почек, избытке оксалатов в рационе, гиперкальцемических остеопатиях, избытке кальция в рационе, гиперпаратиреоидизме.

МОРФОЛОГИЯ МОЧЕВЫХ ОСАДКОВ

Различные осадки (почечные цилиндры, клетки эпителия и др.) обнаруживают при микроскопическом исследовании центрифугата мочи (центрифугируют при 1500 об/мин в течение 15 мин).

Почечные цилиндры соответствуют просвету канальцев, в которых они образуются. Величина цилиндров различная: гиалиновые больше зернистых и восковидных. Ширина их 12—50 мкм. При микроскопии зернистые цилиндры дифференцируются по их зернистости, а восковидные — по преломлению ими лучей света (рис. 5). Труднее обнаружить гиалиновые цилиндры, так как они прозрачны. Выявление их облегчается тем, что они своей поверхностью часто соприкасаются с минеральными и органическими образованиями мочи различной природы. Для обнаружения цилиндров в центрифугат добавляют йод, фуксин, метиленовую синьку, пикриновую кислоту. Однако при соответствующем навыке можно обойтись и без окраски мочи.

Чаще всего цилиндры в моче обнаруживают при заболевании почечной паренхимы. При нефрозе в большом количестве (кроме клеток почечного эпителия) находят как зернистые, так и гиалиновые цилиндры (рис. 6, *А*).

Рис. 6. Гиалиновый цилиндр с наложениями клеток крови (*А*) и жировые цилиндры (*Б*).

Зернистые цилиндры делят на крупно- и мелкозернистые. Зернистость может быть альбуминозной, жировой и липоидной природы. Первая выглядит стеклой, а две другие, особенно жировая, блестящие. Жировой характер включений можно определить, используя осьмиевую кислоту или окраску суданом. Зернистость липоидного происхождения всегда является результатом перерождения. Появление таких цилиндров характерно для заболеваний, развивающихся медленно, но прогрессивно (нефроз, хронический паренхиматозный нефрит). Обнаружение обеих форм двоякопреломляющей зернистости (жировая и липоидная) является плохим прогностическим признаком (цв. табл. V и рис. 6, *Б*). Чаще встречаются мелкозернистые цилиндры, что указывает на органическое заболевание паренхимы почек, но не отражает формы данной болезни. Мелкозернистые цилиндры, эритроциты, клетки почечного эпителия, гиалиновые, эритроцитарные и эпителиальные цилиндры находят при остром гломерулонефрите, мелкозернистые и гиалиновые цилиндры, а также клетки почечного эпителия — при хронических нефрозе и нефрите.

Восковидные цилиндры имеют желтый оттенок; появляются они в основном при тяжелых хронических заболеваниях почечной паренхимы, но их находят и при острых случаях и при отравлении минеральными ядами.

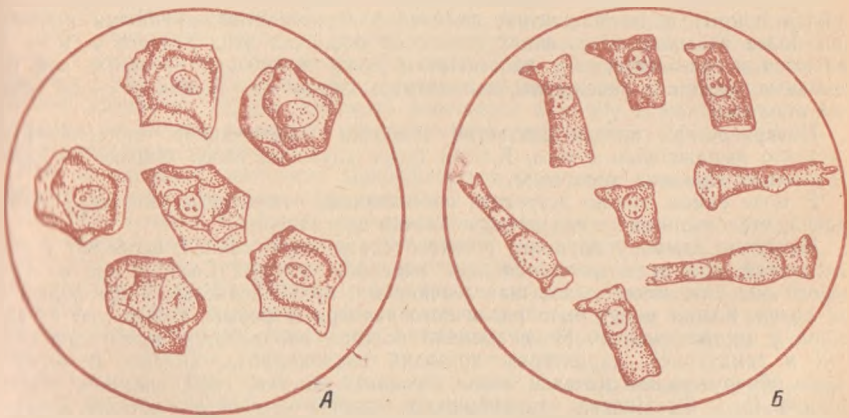


Рис. 7. Эпителиальные клетки:
А — мочевого пузыря; *Б* — бокаловидные клетки почечной лоханки.

Рис. 8. Гнойные нити в моче (*А*); спермии, округлые эпителиальные клетки, лейкоциты, зернышки мочекислых солей и трипельфосфата в моче (*Б*).

Эритроцитные цилиндры под микроскопом имеют зеленовато-желтую окраску; иногда на них видны очертания эритроцитов. Появляются эритроцитные цилиндры при нефрите (см. цв. табл. V). При почечном кровотечении осадок имеет вид мельчайшего порошка, а моча над ним мутноватая, окрашенная кровью. При кровотечении же в мочевом пузыре или лоханке моча над осадком довольно прозрачная и почти свободна от кровяной окраски, а осадок состоит из кровяных сгустков большей или меньшей величины, иногда соответствующих по величине и форме месту их образования; так, при пузырных кровотечениях отмечают большие сгустки, при лоханочных — маленькие.

Эпителий мочевых канальцев (почечный эпителий) в осадке мочи обнаруживается в виде скоплений (цв. табл. VI). Клетки по размерам несколько крупнее лейкоцитов, полигональной формы, с зернистой цитоплазмой и округлым ядром; появляются в моче при тяжелых поражениях почек.

Эпителий почечной лоханки — трехслойный, плоский, переходный. Поверхностные клетки больше по размерам, продолговатой, клинообразной формы, с округлым ядром (рис. 7). Клетки среднего слоя несколько меньшего размера. При тяжелых поражениях в моче появляются мелкие овальные, иногда хвостатые цилиндрические и призматические клетки глубоких слоев.

Поверхностный слой слизистой оболочки мочевого пузыря, уретры и влагалища покрыт полигональными, со слабой зернистостью, крупными клетками. При более тяжелых поражениях слизистой оболочки этих отделов в моче появляются веретенообразные, хвостатые и даже небольшие овальные или грушевидные клетки с небольшим компактным ядром из глубоких слоев слизистой оболочки.

Поверхностные клетки слизистой оболочки мочеточников — продолговатые, с хорошо выраженным ядром. Клетки более глубоких слоев меньше по размеру, веретенообразные, хвостатые.

В моче самок можно встретить ороговевшие, чешуйчатые, без ядра клетки Аллена, отслоившиеся от слизистой оболочки влагалища.

Почечные камни у крупного рогатого скота, овец, свиней, особенно у пушных зверей, иногда встречаются как массовое явление. Состоят они из углекислого кальция, мочекислых, щавелевокислых, кремневокислых и фосфорнокислых солей. Камни могут быть различного размера и формы, количество их единичное и множественное. Мочекаменная болезнь проявляется почечными коликами и гематурией, характерны признаки пиелонефрита, анурии. В мочевом осадке обнаруживают мочевой песок, кровяные клетки, гной, спермии, сгустки фибрина (рис. 8). Иногда устанавливают наличие камней в почечной лоханке. При задержании мочи развиваются уремия, гидронефроз, нефрит.

Источники: 13, 72, 111—114.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СОДЕРЖИМОГО РУБЦА

ВЗЯТИЕ СОДЕРЖИМОГО РУБЦА И ПОДГОТОВКА ПРОБ К АНАЛИЗУ

Процессы пищеварения в рубце изучают как на интактных животных, так и на животных с фистулами рубца.

У интактных животных содержимое рубца берут с помощью пищеводного зонда. Иногда через этот зонд содержимое рубца выливается самотеком, но чаще зонд соединяют с колбой Бунзена, в которой создается вакуум с помощью насоса Комовского. Для овец можно использовать обычные желудочные зонды, выпускаемые медицинской промышленностью. Однако более удобным считается зонд из эластичной вакуумной резиновой трубки с наружным диаметром около 15 мм, внутренним 6—8 мм. Длина трубки примерно 120—150 см. На конце трубки предусмотрены 5—8 небольших отверстий. При взятии проб зонд соединяют с колбой Бунзена.

У ягнят в первые дни после рождения содержимое рубца можно получить с помощью зонда из мягкой резиновой трубки диаметром около 1,5 мм, на одном его конце 3—4 отверстия. Зонд соединяют со шприцем Жанэ, в который оттягивают содержимое. У более старших ягнят в качестве зонда используют резиновую трубку с большим диаметром, соединяя ее с колбой Бунзена и насосом. Длина зонда в каждом случае зависит от размеров животного.

Для телят в первые недели жизни употребляют зонд из мягкой, но в то же время упругой резиновой трубки с внешним диаметром около 7 мм, длиной 130—140 см. Вводят его через ротовую или носовую полость. Содержимое рубца извлекают с помощью шприца Жанэ. По мере роста теленка желудочный зонд должен быть большего диаметра и длины.

Техника введения зонда довольно простая. Предварительно зонд смазывают вазелиновым маслом или вазелином. Рот раскрывают и хорошо фиксируют язык, обхватив его полотенцем. У мелких животных целесообразно использовать зевник, лучше деревянный. Зонд вводят осторожно по пищеводному желобу. При попадании зонда в трахею у животного отмечаются беспокойство, кашель. В этом случае зонд несколько оттягивают и придают ему нужное направление. Если зонд попал в рубец, отмечают характерный запах или вытекание рубцовой жидкости. Чтобы избежать попадания в пробу слюны (что может отразиться на данных анализа), первые порции содержимого лучше удалить, а берут последующие порции.

При определении состояния микрофлоры рубца зонд предварительно стерилизуют 30 мин в автоклаве при давлении 1 атм.

Для фистульных животных применяют прибор, состоящий из колбы Бунзена, в пробку которой вставлена стеклянная или металлическая трубка, а на нее уже надета резиновая или полихлорвиниловая трубка длиной 30—60 см. Последней колба Бунзена соединяется с насосом Комовского или шприцем Жанэ. Следует учитывать, что пищевая масса в рубце недостаточно гомогенизирована, поэтому пробы по возможности необходимо брать из различных участков рубца, вводя трубку на разную глубину.

Содержимое рубца сразу же после его взятия фильтруют через 4 слоя марли. Полученную жидкость разливают по пробиркам (флаконам), ставят в холодильник и в ближайшее время проводят биохимические анализы. Если пробы берут в хозяйстве, находящемся на большом расстоянии от лаборатории, то их

желательно консервировать хлороформом или толуолом из расчета 6—8 капель на 20 мл содержимого. Транспортируют пробы в термосе со льдом.

Если пробы предназначены для определения количества простейших, их обязательно после взятия консервируют 10%-ным раствором формалина из расчета 5—6 капель на 20 мл содержимого. От формалина простейшие становятся неподвижными, предотвращаются дальнейшее их развитие и лизис. В этих же пробах можно подсчитывать количество бактерий.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ pH

Реакция среды содержимого рубца является важным фактором, определяющим состояние ферментативных процессов, образование метаболитов, их всасывание и использование в организме. Характеризуется реакция среды концентрацией водородных ионов или водородным показателем, обозначаемым символом pH. Величина pH — это отрицательный логарифм концентрации водородных ионов. $pH = -\lg[H^+]$. Это означает, что для 0,1 моль/л раствора любой сильной кислоты pH равен 1, для чистой воды — 7, для 0,1 моль/л раствора сильной щелочи — 13. Следовательно, кислая реакция обусловливается концентрацией ионов водорода H^+, а щелочная — концентрацией гидроксильных ионов OH^-; при нейтральной реакции $pH = 7$.

В растворах pH определяют двумя методами — колориметрическим и электрометрическим. Первый метод, основанный на свойствах некоторых индикаторов изменять свою окраску в зависимости от реакции среды, является наиболее простым, но не совсем точным. Им трудно установить pH в мутных и окрашенных растворах, в том числе и в содержимом рубца, и в большинстве биологических жидкостей; поэтому при таких исследованиях его обычно не применяют.

Электрометрический метод применяют при работе с окрашенными растворами и суспензиями, им достаточно быстро можно определить pH с точностью до ±0,05. Принцип этого метода состоит в том, что при погружении в раствор электрода возникает разность потенциалов между ионами металла электрода и ионами этого же металла, находящимися в растворе. Если в этот же раствор опустить еще стандартный электрод с хорошо известным и устойчивым потенциалом, то электродвижущая сила гальванического элемента будет зависеть от концентрации ионов металла в растворе.

Для определения pH используют гальванические элементы, получающиеся при опускании в раствор двух электродов. Один из них является индикаторным, его потенциал зависит от концентрации водородных ионов, другой — стандартный электрод или электрод сравнения с хорошо устойчивым потенциалом. Электродвижущая сила гальванического элемента измеряется с помощью потенциометра, или pH-метра (лабораторный pH-метр ЛПУ-01, прецизионный лабораторный pH-метр pH-262, универсальный ионометр ЭВ-74, pH-метр ОР-204/1), на шкале которого отмечается значение pH исследуемого раствора.

В качестве индикаторных электродов обычно используют водородный, сурьмяный, хингидронный и стеклянный. Электродами сравнения служат каломельный и хлорсеребряный. При измерении pH биологических жидкостей наиболее распространенным считается стеклянный электрод. К его преимуществам следует отнести то, что он пригоден для измерения pH небольшого количества жидкости, а также растворов, содержащих агрессивные для других электродов вещества, например белки, соли тяжелых металлов и др.

Оборудование и реактивы. pH-метр; буферные растворы; стаканчики на 50, 100 мл; термометр.

Ход определения. Стеклянный и каломельный электроды подготавливают для работы согласно указаниям, изложенным в паспортах на электроды. Устанавливают их в специальном держателе и при помощи соединительных кабелей подключают к прибору.

При работе с прибором ЭВ-74 следует нажать кнопки «анионы/катионы» «pX» и необходимого диапазона измерения, а кнопку «X/X» оставить отжатой, что будет соответствовать измерению активности одновалентных катионов. Предварительно прибор должен быть откалиброван. С этой целью применяют

и стандартные (контрольные) буферные растворы. Обычно используют три раствора; с минимально возможным значением pH, максимально возможным значением и раствор с величиной pH возможно удаленным от применяемой электродной системы. Температура растворов 20°С. Перед погружением в раствор электроды промывают дистиллированной водой и удаляют остатки воды фильтровальной бумагой. Погружая в раствор электроды, следят, чтобы раствор покрывал стеклянный шарик и стержень электрода сравнения, но при этом электроды не должны касаться стенок и дна стакана.

Стандартные буферные растворы обычно входят в комплект прибора, но их можно приготовить и самим, если учесть, что при многократном использовании они портятся.

А. Исходные растворы: 1. 0,05 моль/л раствор бифталата калия $C_6H_4(COOH)(COOK)$ (10 г на 1 л). 2. 0,05 моль/л раствор янтарной кислоты $HOOC—CH_2—CH_2—COOH$ (5,9 г в 1 л). 3. 0,02 моль/л борной кислоты H_3BO_3 (12,37 г в 1 л). 4. 0,05 моль/л раствор буры $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ (19,07 г в 1 л). 5. 0,1 н. (0,05 моль/л) раствор соды N_2CO_3 (19,07 г в 1 л). 6. 0,1 н. (0,1 моль/л) раствор соляной кислоты HCl (8,2 мл до 1 л).

Б. Буферные растворы: pH 3,98 0,05 моль/л раствора бифталата калия; pH 5 158 мл раствора «2» +92 мл раствора «4»; pH 7,09 235 мл раствора «3»+15 мл раствора «4»; pH 9,24 0,05 моль/л раствора буры; pH 11,04 125 мл раствора «5»+7,5 мл раствора «6»+117,5 мл дистиллированной воды.

Следует отметить, что калибровка ионометра весьма сложная и поэтому ее проводят обычно в специализированных мастерских. В условиях лаборатории обычно проверяют работу прибора по стандартному буферу с pH, близким к испытуемому раствору.

При измерении pH необходимо учитывать температуру испытуемого раствора. В последних моделях pH-метров предусмотрена автоматическая термокомпенсация, в других моделях ручку температурной компенсации устанавливают на температуру исследуемого раствора.

При определении pH рубцовой жидкости нажимают кнопку с диапазоном измерения pH 4—9. Жидкость тщательно размешивают, выливают в стаканчик и погружают в него электроды, предварительно тщательно промытые дистиллированной водой и просушенные фильтровальной бумагой; показания отмечают на шкале прибора. Для точного измерения отсчет показания проводят через 1,5—3 мин, так как в течение этого времени устанавливается состояние равновесия между электродами и раствором.

По окончании измерений прибор выключают, электроды тщательно промывают и погружают в стакан с дистиллированной водой.

Клиническое значение. Показатель pH имеет большое значение для создания нормальных условий течения процессов ферментации корма в рубце. Видовой состав микроорганизмов, их активность, образование и всасывание органических кислот, аммиака, моторная функция рубца и сетки в значительной степени обусловлены реакцией среды.

Пределы колебаний pH содержимого рубца зависят в основном от уровня бикарбоната, фосфата и слабых органических кислот. Нормальный pH (6—7,3) поддерживается в рубце следующими факторами: а) естественным поступлением щелочи в рубец со слюной и кормами; б) удалением из рубца кислот в результате их всасывания в кровь и перехода с химусом в нижележащие отделы пищеварительного канала; в) благодаря буферным свойствам содержимого (бикарбонат, фосфат, белок и др.) и самих органических кислот. Вышеуказанные буферные механизмы действуют значительно медленнее при резком повышении кислотности в рубце. Если, например, при быстром сбраживании сахара образуется большое количество кислоты, нейтрализующая способность буферных механизмов подавляется.

При повышенной кислотности pH 4—5 отмечаются признаки острого расстройства пищеварения, животные теряют аппетит, наступает атония рубца, дефекация учащенная.

Повышенная щелочность содержимого рубца также может быть причиной угнетения моторной функции преджелудков. При pH выше 7,5 возможен парез рубца. Сохранение высокого pH в рубце длительное время приводит к потере аппетита, торможению процессов переваривания сахара и клетчатки.

Однако процессы пищеварения нарушаются не только при изменении pH в рубце. Так, острое расстройство пищеварения обусловливается комплексом факторов и, в частности, интенсивностью образования метаболитов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ЛЕТУЧИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В РУБЦОВОЙ ЖИДКОСТИ И ИХ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Поступившие в рубец жвачных углеводы под действием ферментов микроорганизмов рубца гидролизуются с последующим образованием летучих жирных кислот (ЛЖК). Основной процент кислот — 55—70 составляет уксусная кислота, 15—22 — пропионовая, 10—15 — масляная, и лишь 2—5% приходится на долю кислот с большим числом углеродных атомов (изомасляную, изовалериановую, валериановую и капроновую).

Общая концентрация ЛЖК и количество отдельных из них в значительной степени зависят от вида и возраста животных, состава рациона и времени, прошедшего после кормления. Концентрация ЛЖК в рубце крупного рогатого скота — 6—14 ммоль/100 мл, у овец — 5—15 ммоль/100 мл. До кормления уровень ЛЖК бывает самым низким. Максимум концентрации наблюдается через 2—3 ч после кормления при использовании рационов с оптимальным соотношением грубых, концентрированных и сочных кормов и через 3—5 ч, если в рационе преобладает сено или солома.

Характер рациона влияет не только на суммарную концентрацию ЛЖК, но и на соотношение кислот брожения. Преобладание в рационе грубых кормов ведет к увеличению в рубце уксусной кислоты, тогда как увеличение доли зерновых концентратов, тонкий помол корма или дача его в форме гранул способствуют обычно увеличению количества пропионовой кислоты и частично масляной. Доля последней часто увеличивается при содержании животных на рационах с большим количеством белка.

Величина pH оказывает значительное влияние на метаболические процессы в рубце и образование кислот брожения. При включении в рацион большого количества легкоферментируемых сахаров pH становится 5,2—5,6, при этом возрастает общее количество ЛЖК и в том числе увеличивается содержание пропионовой и масляной кислот за счет снижения доли уксусной. Однако pH 3,7—4 неблагоприятно действует на микрофлору рубца, при этом снижается число целлюлозолитических бактерий, погибают простейшие. У животных пропадает аппетит, наступают атония рубца и нарушение пищеварения. При включении в рацион большого количества, например, сахарной свеклы (без предварительного приучения к ней) наступают резкие сдвиги в процессах обмена, возможна даже гибель животных.

Резкий сдвиг в соотношении кислот брожения отмечают и при включении в рацион большого количества зерновых концентратов и низком уровне клетчатки. Изменение соотношения кислот брожения в рубце, как правило, значительно влияет на обмен веществ, продуктивность и состав молока животных. Повышение доли пропионата обычно ассоциируется со снижением жирности молока.

Интенсивность образования кислот брожения в рубце в зависимости от типа кормления и технологической подготовки кормов, использование отдельных кислот в энергетическом обмене, а также как предшественников глюкозы и составных частей молока и, наконец, нарушение их утилизации организмом (развитие ацидоза и кетонемии) — все эти вопросы приобретают важное значение в связи с применением в кормлении жвачных большого количества зерновых концентратов, силосованных кормов (особенно невысокого качества), гранулированных кормосмесей. Получение достоверных данных об общей концентрации летучих жирных кислот в рубце и их соотношении является крайне необходимым для правильной организации кормления продуктивных жвачных животных и для диагностики возможных нарушений функций пищеварения и обмена веществ.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ЛЕТУЧИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В РУБЦОВОЙ ЖИДКОСТИ

Принцип метода состоит в том, что под действием горячего пара происходит возгонка летучих жирных кислот, находящихся в рубцовой жидкости, количество которых определяется в дистилляте путем титрования раствором щелочи.

Реактивы. 1. Смесь насыщенного раствора сернокислого магния в 2,5%-ном растворе серной кислоты (25 мл концентрированной серной кислоты на 1 л насыщенного раствора $MgSO_4$).

2. 0,1 н. раствор NaOH.

3. Индикатор — фенолфталеин.

Оборудование. Аппарат Маркгама; нагреватель; стаканчики; прибор для аэрации.

Ход определения. Из общей пробы отфильтрованной рубцовой жидкости берут 5 мл и разводят в таком же объеме раствора сернокислого магния в серной кислоте. Затем 4 мл полученной смеси (эквивалентные 2 мл рубцовой жидкости) переносят в аппарат Маркгама для отгонки. Последний состоит из двухстенной трубки (рис. 9). Пробу заливают осторожно во внутреннюю трубку через воронку. Пар из парообразователя проходит между наружной и внутренней трубкой, обогревает внутреннюю трубку и затем через отверстие поступает во внутреннюю камеру. Под действием пара происходит возгонка летучих жирных кислот, которые вместе с водяными парами попадают в холодильник, где и происходит их конденсация. Полученный дистиллят в количестве 50 мл собирают в стаканчик и титруют 0,1 н. раствором щелочи в присутствии индикатора — фенолфталеина.

Перед титрованием удаляют углекислый газ из дистиллята аэрацией воздухом, свободным от CO_2, в течение нескольких минут. Для этого воздух обычно пропускают через раствор натриевой щелочи с помощью простейшей установки (типа аппарата Боброва) для удаления углекислого газа в пробе.

Для контроля полноты извлечения ЛЖК из пробы рубцовой жидкости желательно продолжить дистилляцию и провести титрование второй порции дистиллята (50 мл).

Отработанная проба из внутренней камеры извлекается автоматически при охлаждении парообразователя. При хорошей герметизации в приборе создается разряжение, в результате содержимое из внутренней камеры отсасывается в наружный цилиндр, собирается в его нижней части вместе с конденсатом водяного пара и удаляется из аппарата.

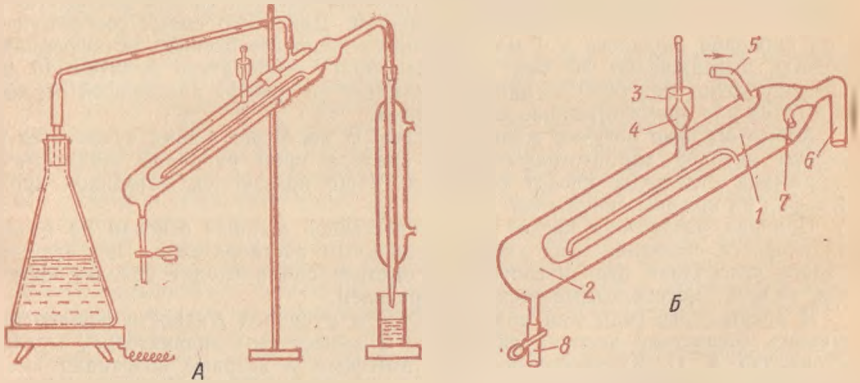


Рис. 9. Определение летучих жирных кислот с помощью аппарата Маркгама (*А*); устройство аппарата Маркгама (*Б*):

1 — внутренняя и *2* — наружная камеры; *3* — воронка; *4* — пробка к воронке; *5* — трубка для входа и *6* — для выхода пара; *7* — каплеуловитель; *8* — слив.

Концентрацию летучих жирных кислот рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 0,1 \cdot 100}{Б}, \text{ или } X = A \cdot 5,$$

где X — концентрация ЛЖК (ммоль) в 100 мл рубцовой жидкости; A — количество (мл) 0,1 н. раствора щелочи, пошедшего на титрование; 0,1 — показатель нормальности раствора; 100 — пересчет концентрации ЛЖК на 100 мл рубцовой жидкости; $Б$ — количество рубцовой жидкости, взятой на анализ (в данном случае 2 мл).

Например, на титрование дистиллята, полученного при отгонке пробы, пошло 1,88 мл 0,1 н. раствора NaOH: $X = (1,88 \cdot 0,1 \cdot 100) : 2 = 9,40$ моль/100 мл.

Приведенную методику и расчеты используют для получения данных о концентрации в рубцовой жидкости свободных и связанных ЛЖК.

Однако иногда появляется необходимость получить данные о раздельной концентрации свободных и связанных ЛЖК. С этой целью вначале определяют свободные ЛЖК. 2 мл нативной рубцовой жидкости заливают в аппарат Маркгама вместе с 1—2 каплями метилвиолета в качестве индикатора. Паровая дистилляция осуществляется так же, как описано выше. Дистиллят собирают в два стаканчика по 15 мл. Титруют 0,1 н. раствором NaOH при индикаторе — фенолфталеине. Отсутствие во втором стаканчике кислот свидетельствует об их полной отгонке. Затем в аппарат Маркгама через воронку добавляют 50%-ный раствор серной кислоты до тех пор, пока цвет индикатора не станет желтым. Дистилляция возобновляется для отгонки связанных кислот. Дистиллят собирают в объеме 30 мл.

Расчеты концентрации кислот проводят по вышеприведенной формуле.

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛЕТУЧИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Подготовка пробы к хроматографическому анализу. Полученный после отгонки пробы дистиллят после титрования переливают в фарфоровые чашки, которые помещают в сушильный шкаф (температура 65°С) для выпаривания. Если сразу не будут проводить хроматографический анализ, то выпаренные соли кислот переносят в маленькие стаканчики и пробы вторично высушивают. В таком состоянии соли кислот можно хранить длительное время.

В последние годы широкое распространение получил способ хроматографического анализа нативной рубцовой жидкости. Для этого смесь, состоящую из 5 мл рубцовой жидкости и 1 мл 25%-ной свежеприготовленной метафосфорной кислоты, выдерживают 30 мин при комнатной температуре и затем 10 мин центрифугируют при 3000 об/мин. Центрифугат не требует дальнейшей обработки и готов для хроматографического анализа.

Хроматография летучих жирных кислот. В настоящее время существует несколько методов хроматографического анализа проб рубцовой жидкости на содержание отдельных кислот брожения. Чаще пользуются методикой хроматографии на колонке силикагеля.

Принцип разделения кислот на силикагелевой колонке основан на различной скорости смывания этих кислот подвижным растворителем. При этом чем длиннее углеродная цепь кислоты, тем быстрее она проходит колонку силикагеля, то есть быстрее вымывается растворителем.

В предыдущие годы для анализа ЛЖК в рубцовой жидкости широко применялась бесцветная колонка силикагеля с вынесенным индикатором, модифицированная А. П. Кротковой и Н. И. Митиным и впервые описанная ими в 1957 г. Эта методика не потеряла своего значения и сейчас. Однако сложность и длительность подготовки силикагеля, а также большие затраты времени на разгонку отдельных проб постепенно вытесняют эту методику из аналитической работы лабораторий и ее место занимает более совершенная методика газожидкостной хроматографии с использованием колонок с наполнителями.

Теория газожидкостной хроматографии и принципы работы на газовом хроматографе достаточно подробно описаны в прилагаемых к приборам инструкциях. Аналитическое значение хроматографа состоит в том, чтобы разделить сложную смесь соединений на составляющие компоненты. О качестве разделения кислот судят по количеству пиков и по расстоянию, на котором они находятся один от другого. Поэтому основными задачами исследователя являются достижение полного разделения в пробе каждой смежной пары веществ за приемлемое время анализа, идентификация пиков, определение содержания кислот в пробе.

При подготовке прибора к анализу важными условиями считаются выбор и подготовка твердого носителя. Главное назначение твердого носителя — обеспечение основы для нанесения неподвижной жидкой фазы в виде равномерной тонкой пленки вокруг его частиц. Он не должен адсорбировать кислоты пробы, а после закрепления пленки быть таким же сухим и сыпучим и нехрупким.

Наиболее эффективными наполнителями для колонок оказались:

1) хроматон N — AWDMCS 0,125—0,160 мм; 2) хромосорб W—AW 80—100 меш, 100—120 меш; 3) целит 545 AW 80—100 меш, 100—120 меш. Наиболее доступный и вполне отвечающий требованиям для анализа ЛЖК — первый из них.

Необработанный твердый носитель перед нанесением неподвижной жидкой фазы отмывают и дезактивируют. Носители типа хроматон заливают пятикратным объемом водной смеси HCl (1 : 1) и оставляют на ночь, а затем многократным промыванием воды удаляют кислоту и сушат при температуре +150°С 12 ч. После этого носитель обрабатывают 5%-ным раствором NaOH в метаноле (на 40 г носителя 200 мл раствора) в течение 3 ч. Раствор удаляют отстаиванием в воронке с дном из пористого стекла. В заключение носитель промывают 200 мл метанола, 100 мл хлороформа и сушат при комнатной температуре.

Носители, которые поступают в продажу, в большинстве случаев дезактивированы — промыты кислотой и обработаны парами диметилхлорсилана или гексаметилдисилазана, и дальнейшей их обработки не требуется.

Неподвижная жидкая фаза должна обеспечивать разделение кислот и не улетучиваться из колонки. В качестве неподвижной жидкой фазы средней полярности применяют твин-80 или полидиэтиленгликольсебацинат.

Существенное влияние на разделение ЛЖК оказывают нанесение неподвижной жидкой фазы на твердый носитель и выбор оптимального их отношения для приготовления сорбента. Количество наносимой жидкой фазы измеряют в граммах и выражают в процентах к массе твердого носителя. Для определения ЛЖК обычно неподвижная жидкая фаза составляет 10% к массе носителя (например, 2 г твина-80 от 20 г хроматона).

Приготовление сорбента проводят путем испарения растворителя из суспензии, состоящей из твердого носителя+раствора неподвижной жидкой фазы. С этой целью взвешивают порцию хроматона и высыпают ее в фарфоровую чашку емкостью 200 мл. В стакан емкостью 200 мл вносят необходимое количество твина-80, приливают растворитель, в данном случае хлороформ, перемешивая и подогревая на водяной бане растворяют твин-80 (нерастворимые остатки удаляют). Приготовленный раствор твина-80 осторожно переносят в чашку, смачивая весь носитель. Слой раствора не должен превышать верхний уровень носителя более чем на 2 мм. Удаляют растворитель путем испарения при комнатной температуре или при слабом подогревании на водяной бане при постоянном помешивании суспензии. Досушивание сорбента и закрепление пленки неподвижной жидкой фазы вначале проводят на воздухе (3—4 ч), а затем в вакуум-сушильном шкафу, лучше в атмосфере азота.

Чтобы добиться хорошего разделения кислот и получить воспроизводимые данные, необходимо правильно подготовить, стабилизировать и использовать колонку.

Для определения ЛЖК используют колонку из нержавеющей стали, длиной 1,5 м, с внутренним диаметром 3 мм. Предварительно колонку тщательно очищают от механических и других примесей. Для этого свернутую в спираль колонку выпрямляют и через нее протаскивают пучок ниток, смоченных раство-

рителями (хлороформом, ацетоном, метанолом, гексаном и снова хлороформом). Затем один конец выпрямленной трубки плотно закрывают тампоном стеклоты, колонку укрепляют в вибраторе вертикально и осторожно через воронку в другой конец небольшими порциями равномерно засыпают готовый сорбент.

После наполнения колонки отверстие закрывают стекловатой. Осторожно сворачивают колонку в спираль по размерам термостата и устанавливают на стабилизацию, которая проводится до 36 ч в режиме анализа (температура термостата колонки 120°, газ-носитель — азот), а в последние 6—8 ч температуру увеличивают на 6—10°. Если при максимальной чувствительности прибора отсутствует систематический дрейф нулевой линии и беспорядочные отклонения пера от прямой, то колонка считается хорошо стабилизированной.

Разделительную способность колонки определяют путем проведения анализа за стандартной смеси ЛЖК. Чтобы установить молярный процент каждой летучей жирной кислоты, нужно иметь стандартный раствор этих кислот в количестве, приближенном по составу кислот содержимого рубца. Обычно смесь готовят, исходя из соотношения кислот: уксусная — 63%, пропионовая — 17%, изомасляная — 3%, масляная — 10%, изовалериановая — 2%, валериановая — 3%, капроновая — 2%. Приготовленную смесь герметизируют и хранят в холодильнике не более месяца.

Количественные измерения основаны на определении площади пика на хроматограмме каждой кислоты. Площадь пика пропорциональна концентрации кислоты. Однако, чтобы получить точные количественные результаты, необходимо знать индивидуальную чувствительность детектора к той или иной кислоте. Для этого предварительно проводят калибровку прибора. По стандартным смесям устанавливают количественную связь между сигналом детектора и площадью соответствующего пика и выводят поправочные коэффициенты.

Определение поправочных коэффициентов проводят обычно в начале и конце работы. В хроматограф вводят примерно 0,1—0,4 мкл (на кончике шприца) стандартного раствора. Можно предварительно часть смеси разбавить водой до концентрации, близкой по содержанию ЛЖК анализируемой пробы рубцовой жидкости (6—15 ммоль на 100 мл). В этом случае в хроматограф вводят от 1 до 5 мкл стандартной смеси.

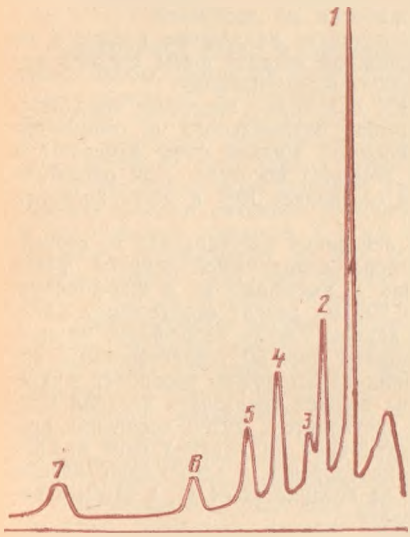


Рис. 10. Хроматограмма летучих жирных кислот содержимого рубца:

1 — уксусная; *2* — пропионовая; *3* — изомасляная; *4* — масляная; *5* — изовалериановая; *6* — валериановая и *7* — капроновая кислоты.

Измеряют параметры пиков и вычисляют средний за день поправочный коэффициент для каждой кислоты.

Аналогичным образом вносят в хроматограф исследуемую пробу рубцовой жидкости. Если анализируют нативную рубцовую жидкость после осаждения метафосфорной кислотой, то в прибор вносят примерно 0,2—0,8 мкл центрифугата пробы. Если приходится исследовать высушенные соли ЛЖК, то их предварительно растворяют. Ряд авторов рекомендуют в качестве растворителя применять хлороформ или гексан. Однако в этом случае не всегда получаются сопоставимые результаты. Возможно, это связано с разной степенью растворимости отдельных кислот или разной скоростью их испарения из растворов. В настоящее время предложено при переводе солей летучих жирных кислот в свободные кислоты использовать 10%-ный раствор серной или ортофосфорной кислоты. С этой целью в стаканчик с высушенным дистиллятом добавляют 0,5 мл раствора одной из указанных кислот. Полученный раствор вводят в хроматограф приблизительно в таком же

количестве, как и стандартный раствор. Количество пробы, вносимой в прибор, определяется чувствительностью хроматографа. Следует подобрать такую чувствительность прибора и дозу вносимого раствора, чтобы высоты пиков кислот стандартной смеси и пробы были близкими.

Расчет хроматограммы ЛЖК. Существует несколько способов измерения площади пиков. Подробно они изложены в методических указаниях, составленных В. К. Пустовым (1978). Чаще других на практике применяют метод треугольника, по которому площадь пика будет равна произведению его высоты от основания до вершины на ширину пика в половине его высоты.

Подсчитывают площади пиков кислот стандартной смеси. Затем рассчитывают процентное содержание каждой кислоты от суммы площадей всех пиков. Эти цифры обычно не совпадают с истинными молярными процентами кислот в стандартной смеси. Поэтому необходимы поправочные коэффициенты. Для этого молярные проценты стандартной смеси следует разделить на проценты, полученные во время подсчета пиков на хроматограмме.

Аналогичным образом высчитывают площадь пиков для каждой кислоты испытуемой пробы. Чтобы определить молярный процент каждой кислоты, необходимо высчитанную площадь пиков умножить на поправочный коэффициент. Затем все эти произведения по каждой кислоте суммируют и находят молярный процент путем деления этих трех чисел на общую их сумму.

Образец хроматограммы, полученный при разгонке пробы содержимого рубца коровы, см. рис. 10 и табл. 28.

Расчет хроматограммы

ЛЖК	Высота, h	Ширина в половине высоты, d	Поправочный коэффициент, k	Произведение $h\ d\ k$	Молярный процент
Уксусная	12,80	0,25	1,83	5,86	66,21
Пропионовая	4,30	0,40	0,90	1,55	17,51
Изомасляная	1,00	0,60	0,35	0,21	2,37
Масляная	3,20	0,50	0,56	0,90	10,17
Изовалериановая	0,45	0,65	0,39	0,11	1,24
Валериановая	0,20	1,00	0,59	0,12	1,36
Капроновая	0,15	1,25	0,54	0,10	1,14
Сумма					100,0

Источники: 54, 58, 59, 61, 99.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ В РУБЦОВОЙ ЖИДКОСТИ

Одним из промежуточных продуктов переваривания углеводов в рубце является молочная кислота. Обычно в рубцовой жидкости она находится в виде следов, после кормления ее уровень 0,15—0,50 ммоль на 100 мл. Однако при введении в рацион большого количества кормов, богатых крахмалом (зерно кукурузы, ржи, ячменя) или сахаром (сахарная, кормовая свекла, яблоки или продукты их переработки), а также при резком переходе с рациона, бедного концентратами, на рацион с большим количеством зерновых концентратов или грубистых кормов уровень молочной кислоты может резко возрасти — до 3—4 ммоля/100 мл (иногда и больше). В рубце значительно снижается показатель pH (до 5—4). Молочная кислота в избыточных количествах начинает поступать в кровь, вызывая сдвиг кислотно-щелочного равновесия в кислую сторону. Все это нарушает пищеварение. Животные теряют аппетит, нарушается акт глотания, животные испытывают жажду, но не могут пить. Наступает атония преджелудков. Возможна даже гибель животных от некомпенсированного ацидоза, при этом концентрация молочной кислоты в рубце достигает 16—17 ммоль/100 мл.

Для количественного определения молочной кислоты был рекомендован ме-

тод Баккера и Саммерсона. Принцип его заключается в том, что молочная кислота при кипячении с серной кислотой разлагается до ацетоальдегида, который при взаимодействии с п-оксидифенилом в присутствии ионов меди образует продукт фенольной конденсации, окрашивающий раствор в фиолетовый цвет. Интенсивность окраски пропорциональна количеству ацетоальдегида, а следовательно, и количеству молочной кислоты. Однако этот метод оказался недостаточно эффективным из-за того, что не всегда удается исключить пигментацию центрифугата.

Более доступным и точным считают **метод Гордона и Квасля, модифицированный применительно к рубцовой жидкости** А. П. Кротковой, Н. В. Курилович и Н. Г. Портновой (1966).

Принцип метода основан на том, что при окислении молочной кислоты сульфатом церия происходит реакция: $CH_3CHOHCOOH+2Ce^{4+} \rightarrow CH_3CHO+CO_2+2H^{+}+2Ce^{3+}$. Образовавшийся ацетоальдегид улавливается бисульфитом и определяется йодометрически.

Оборудование. Аппарат для определения молочной кислоты; нагреватель; вазелиновая баня; термометр.

Реактивы. 1. 0,05 н. (0,0125 моль/л) раствор церия сульфата ($[Ce(SO_4)_2 \cdot 4H_2O]$ четырехвалентного сернокислого окисного водного в 1 н. (0,5 моль/л) растворе серной кислоты.

2. 10 н. (5 моль/л) раствор серной кислоты.
3. 0,5%-ный раствор метабисульфита натрия.
4. 0,1 н. (0,005 моль/л) раствор йода.
5. 0,5%-ный раствор крахмала.
6. 0,3 н. раствор $Ba(OH)_2$ или 0,3 н. (0,3 моль/л) раствор NaOH.
7. 5%-ный раствор сернокислого цинка.
8. Двууглекислый натрий (порошок).
9. Гидроокись кальция (порошок).
10. 20%-ный раствор сернокислой меди.
11. 40%-ный раствор едкого кали.

Приготовление рабочего раствора сульфата церия: вначале готовят в небольшом количестве основной 0,5 н. (0,125 моль/л) раствор сульфата церия в 1 н. серной кислоте. Для этого точно взвешивают 5,05 г $Ce(SO_4)_2 \cdot 4H_2O$ (грамм-эквивалент этого вещества равен 101,07) и растворяют в 100 мл 1 н. раствора серной кислоты. Непосредственно перед началом анализа приготавливают уже рабочий 0,05 н. раствор.

Аппарат для определения молочной кислоты состоит из колбы, изготовленной из тугоплавкого стекла, с конусовидным дном, парообразователя, отстойника, холодильника и приемника. Нагревателем служит электроплитка большой мощности. Для поддержания в колбе температуры 104—107°С последнюю помещают в баню с вазелиновым маслом. В пробку колбы вмонтированы воронка с делениями от 0 до 25 мл, трубка от парообразователя, трубка отстойника и каплеулавливатель, который соединяется с холодильником.

Ход определения. Предварительно в рубцовой жидкости проводят осаждение белков и сахаров. Для осаждения белков 1 объем рубцовой жидкости разводят 5 мл дистиллированной воды и добавляют 2 объема 0,3 н. NaOH и 2 объема 5% $ZnSO_4$. Смесь тщательно перемешивают и центрифугируют 15 мин при 4500 об/мин. 10 мл центрифугата будут равны 1 мл нативной рубцовой жидкости. Затем осаждают сахара: к 5 мл безбелкового центрифугата добавляют 0,5 мл 20%-ного раствора сернокислой меди, 3 капли 40%-ного раствора KOH, 0,5 г порошка гидроокиси кальция и общий объем доводят до 10 мл. Центрифугируют 15 мин при 4500 об/мин.

Аппарат для перегонки тщательно промывают и пропаривают. Его считают готовым для работы, если температура в перегонной колбе будет постоянной в пределах 104—107°С и скорость образования пара достигнет 15 мл/мин (мощная струя из отстойника), то есть когда создадутся оптимальные условия для окисления молочной кислоты и образования ацетоальдегида.

В реакционную колбу вносят через воронку 0,5 мл вторичного центрифугата рубцовой жидкости. Под холодильник подставляют стаканчики или колбочки (стекло должно быть белым прозрачным) с 3 мл 0,5%-ного бисульфита натрия так, чтобы кончик холодильника был помещен в жидкость. Затем в реакцион-

[illegible] колбу по каплям добавляют 5 мл рабочего раствора сульфата церия с та[illegible] расчетом, чтобы следующая капля падала после обесцвечивания предыдущей [illegible] д. При получении в колбе желтого окрашивания сульфат церия выливают [illegible] сразу. Когда уровень жидкости в приемной колбочке достигнет 20 мл, ее [illegible]жно отставить.

Реакционную колбу тщательно промывают водой не менее 2 раз, отодви[illegible] плитку от парообразователя.

Затем проводят йодометрию. В приемную колбочку добавляют 2—3 капли [illegible]рахмала и оттитровывают (при дневном свете) избыток бисульфита натрия [illegible] раствором йода до бледно-голубого окрашивания. Если прибавлено слиш[illegible] много йода, его избыток можно оттитровать слабым 0,01—0,02 н. раство[illegible] тиосульфита или же 0,5%-ным раствором бисульфита. Для разрушения [illegible]мплекса бисульфита с альдегидом на кончике скальпеля добавляют прибли[illegible]ительно 0,3 г двууглекислого натрия ($NaHCO_3$). Раствор обесцвечивается. [illegible]еакция смеси должна быть щелочной, но не следует создавать избытка $NaHCO_3$, так как при этом трудно определить конец титрования. Освободив[illegible]ийся бисульфит после размешивания титруют до бледно-голубого окрашивания [illegible],01 н. раствором йода, количество которого строго учитывают. Титрование счи[illegible]ается оконченным, если раствор не обесцвечивается в течение 20—30 с.

Расчет. Если на титрование 5 мл вторичного центрифугата после его отгон[illegible] пошло n мл 0,01 н. раствора йода, то на 10 мл центрифугата должно пойти:

$$\begin{array}{l} 5 \text{ мл} — n \text{ мл} \\ 10 \text{ мл} — X \text{ мл} \end{array} \qquad X = \frac{10}{5} = 2n \text{ мл}.$$

10 мл вторичного центрифугата соответствуют 0,5 мл рубцовой жидкости; [illegible]ледовательно, на 1 мл рубцовой жидкости пойдет $(2n \text{ мл} \cdot 2) = 4n$ мл 0,01 н. [illegible]раствора йода.

Молочная кислота одноосновная, поэтому концентрация вещества в нор[illegible]альных и молярных растворах ее одинакова, то есть 1 мл 0,01 н. раствора бу[illegible] соответствовать 0,01 ммоля.

Учитывая, что молекула йода реагирует с двумя молекулами бисульфита, [illegible]одержание молочной кислоты в 100 мл рубцовой жидкости можно будет рас[illegible]итать по формуле:

$$X \text{ ммоль молочной кислоты в 100 мл} = \frac{4n \text{ мл } 0{,}01 \text{ н. йода} \cdot 100}{2},$$

$$\text{или } 2n \text{ мл } 0{,}01 \text{ н. йода} = X \text{ ммоль/100 мл молочной кислоты.}$$

Например, на титрование дистиллята пошло 0,29 мл 0,01 н. раствора йода; [illegible]ледовательно, концентрация молочной кислоты в пробе рубцовой жидкости [illegible]удет $(0{,}29 \cdot 2) = 0{,}58$ ммоль/100 мл.

При соблюдении всех требований анализа выход молочной кислоты состав[illegible]ет 98—99%.

Источники: 55, 98.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЗОТИСТЫХ ВЕЩЕСТВ [illegible] СОДЕРЖИМОМ РУБЦА

Азотсодержащие вещества в содержимом рубца жвачных животных пред[illegible]ставлены белком микроорганизмов, нераспавшимся протеином корма, конечными [illegible] промежуточными продуктами азотистого обмена (аммиак, свободные амино[illegible]слоты, пептиды и др.). В зависимости от состава рациона и времени суток [illegible]онцентрация азотистых веществ значительно колеблется. Например, концентра[illegible]ия общего азота в рубцовой жидкости у коров может составлять от 50 до [illegible]0 мг% (мг на 100 мл), у овец — 60—250 мг%, концентрация небелкового (ос[illegible]аточного) азота — соответственно от 15 до 60 и от 10 до 50 мг%, а уровень [illegible]лкового азота — от 35 до 200 и от 40 до 240 мг% (приложение 13).

Большое значение в процессах превращения питательных веществ корма в рубце имеет аммиак — конечный продукт превращения белковых и небелковых веществ корма. Концентрация азота аммиака в известной степени соответствует уровню небелкового азота. Количество аммиака, образующегося в рубце, зависит в первую очередь от количества и качества кормового белка и азотсодержащих небелковых соединений, а также от интенсивности его использования при синтезе микробного белка и всасывания в кровь. При обычных условиях кормления в рубце крупного рогатого скота и овец концентрация аммиака может составлять от 5 до 40 мг% (аммонийного азота 4—30 мг%). В зимний период кормления концентрация аммиака более низкая, а при весенне-пастбищном содержании и при включении в рацион кормов, богатых легкорастворимым протеином, уровень его находится в верхних границах. Повышается концентрация аммиака, иногда в 2 раза и более в первые часы после приема корма.

Скорость образования аммиака и его концентрация определяются обеспеченностью рационов энергией и использованием аммиака рубцовой микрофлорой. Установлено, что максимальная скорость синтеза белка микроорганизмов происходит при концентрации аммонийного азота в рубце в пределах от 5—8 до 20 мг%. При концентрации аммиака выше 50 мг% микроорганизмы не в состоянии его использовать, и он начинает интенсивно всасываться в кровь. Большая его часть в печени превращается в мочевину. Определенное количество мочевины возвращается обратно в рубец со слюной или диффундирует через его стенку из крови и вступает в новый цикл превращений. Однако превалирующая часть мочевины выделяется из организма с мочой. Особенно много азота теряется при резком увеличении аммиака в рубце. При этом быстрое нарастание аммиака в крови может оказать токсическое действие на организм животного. Если концентрация аммиака в периферической крови достигает 1,02—1,53 мг%, то развиваются признаки отравления. (При обычных условиях кормления концентрация аммиака в периферической крови колеблется от 0,09 до 0,23 мг%.)

Скорость всасывания аммиака зависит и от показателя pH. Из щелочной среды аммиак всасывается быстрее, чем из кислой. Причем с увеличением pH растет число недиссоциированных молекул аммиака. Условия кормления, при которых показатель pH в рубце относительно высок или буферная способность содержимого незначительна, способствует аммиачной интоксикации. Это особенно проявляется при скармливании животным мочевины, введении в рацион большого количества травы с пастбищ, обильно удобренных азотными удобрениями, и при дефиците легкорастворимых углеводов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АММИАКА (АММОНИЙНОГО АЗОТА)

Наиболее распространенным, простым и весьма точным считается микродиффузионный метод Конвея. Принцип его заключается в вытеснении аммиака из аммонийных солей концентрированным раствором щелочи с последующим поглощением его титрованным раствором кислоты.

Для исследования используют специальные чашки Конвея. Некоторые авторы рекомендуют проводить анализы в микродиффузионных сосудах Фойгта и Страгера.

Реактивы. 1. 0,02 н. раствор серной кислоты (0,01 моль/л).

2. Насыщенный раствор K_2CO_3.

3. 0,01 н. (0,01 моль/л) раствор натра едкого.

4. Индикатор Ташира. Готовят два раствора: 1) 50 мг метиленовой синьки растворяют в 50 мл спирта; 2) 100 мг метилового красного (метилрота) растворяют в 50 мл спирта. Затем оба раствора соединяют в равных объемах.

Оборудование. Чашки Конвея; пипетки; бюретка на 2 мл.

Ход определения. Предварительно подготавливают чашку, наружный верхний край чашки смазывают вазелином. Во внутреннюю чашечку заливают точно отмеренное количество 0,02 н. раствора серной кислоты. Исходя из предполагаемого уровня аммиака в пробе объем раствора может быть 2 или 3 мл. Туда же добавляют 3—4 капли индикатора Ташира. В наружную камеру чашки наливают 1 мл рубцовой жидкости и чашку закрывают крышкой. Затем, чуть

приоткрыв крышку, в наружную камеру осторожно, с противоположной стороны от налитой рубцовой жидкости, вливают 2 мл насыщенного раствора K_2CO_3. Крышку быстро закрывают, проверяют герметичность камеры и осторожно смешивают исследуемую жидкость со щелочью.

Параллельно с опытными ставят контрольную, «слепую» пробу, при этом в наружную камеру чашки вместо рубцовой жидкости наливают 1 мл дистиллированной воды. Остальные манипуляции такие же, как и с опытной пробой.

Затем чашки с опытными пробами и контрольные оставляют на время, необходимое для полного вытеснения из анализируемого раствора аммиака и последующего поглощения его раствором серной кислоты. Обычно диффузия при комнатной температуре продолжается не менее 12 ч. Однако чаще всего ее проводят 20—24 ч. По окончании этого срока избыток кислоты оттитровывают 0,01 н. раствором едкого натра до перехода малиновой окраски в зеленую.

Расчет проводят по формуле: $X=(A—Б)\ 0{,}17\cdot100$, где X — количество аммиака в 100 мл жидкости (мг%); A — количество (мл) 0,01 н. раствора едкого натра, пошедшего на титрование контрольной пробы; $Б$ — количество (мл) 0,01 н. раствора едкого натра, пошедшего на титрование опытной пробы; 0,17 — количество аммиака, эквивалентное 1 мл 0,01 н. раствора едкого натра или 1 мл 0,01 н. раствора серной кислоты.

Следует отметить, что данный метод анализа позволяет улавливать не только свободный газообразный аммиак, но и аммиак, находящийся в рубцовом содержимом в связанном состоянии в виде аммония. Поэтому лучше вести расчет содержания в рубцовой жидкости азота аммиака или аммонийного азота по формуле: $X=(A-Б)\ 0{,}14\cdot100$, где 0,14 — количество (мг) аммонийного азота, эквивалентное 1 мл 0,01 н. раствора едкого натра или 1 мл 0,01 н. раствора серной кислоты.

Пример: на титрование контрольной пробы пошло 4 мл 0,01 н. раствора NaOH; на титрование опытной пробы — 2,24 мл 0,01 н. NaOH: $X=(4{,}00-2{,}24)\cdot0{,}14\cdot100=24{,}64$ мг%. Следовательно, в 100 мл рубцовой жидкости содержится 24,64 мг азота аммиака или аммонийного азота.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО АЗОТА

Для определения концентрации общего азота в рубцовой жидкости обычно применяют метод Кьельдаля.

Принцип метода основан на способности органических соединений под действием кипящей серной кислоты окисляться до углекислоты и воды. Азот белковых и близких к ним соединений, входящих в состав исследуемого вещества, гидролизуется, образуя в присутствии воды ионы NH_4^+. Данный метод состоит из трех этапов: минерализации (сжигания) пробы, отгонки аммиака и его определения.

Реактивы. 1. Концентрированная серная кислота.

2. 33%-ный раствор едкого натра.

3. 0,01 н. (0,01 моль/л) раствор едкого натра.

4. 0,01 н. (0,005 моль/л) раствор серной кислоты.

5. Индикатор Ташира.

6. Катализатор, состоящий из сернокислого калия (или натрия), сернокислой меди и селена в соотношении 100 : 10 : 5.

Оборудование. Колбы Кьельдаля на 100 мл; печь или плитка для сжигания образцов; прибор Кьельдаля для перегонки пробы; пипетки; бюретка на 10 мл; индикаторная бумага.

Ход определения. В колбу Кьельдаля осторожно вливают 1 мл рубцовой жидкости (можно взять навеску в пределах 1 г). Туда же наливают 5 мл концентрированной серной кислоты. Чтобы ускорить минерализацию, в колбу добавляют около 1 г катализатора. Колбы ставят в наклонном положении вначале на слабый, а затем на сильный огонь, но не до бурного кипения, так как могут произойти потери азота. Сжигание прекращают, когда жидкость в колбе станет прозрачной, то есть произойдет полное разрушение органического вещества. Для большей гарантии внутренние стенки колбы лучше обмыть дистиллированной водой и пробу еще раз прокипятить.

Отгонку аммиака можно вести в аппарате Кьельдаля любой конструкции. В последние годы хорошо зарекомендовал себя в работе аппарат Сереньева.

Если анализ проводят на установке микро-Кьельдаля, в перегонную колбу переносят весь объем сожженной пробы или часть ее (в последнем случае предварительно ее разводят в мерной колбочке). В приемную колбочку наливают 10—20 мл 0,01 н. раствора серной кислоты и 3—4 капли индикатора Ташира и подставляют ее под стеклянную трубку, соединенную с холодильником аппарата Кьельдаля, погружая конец трубки в раствор кислоты.

Отмеривают 30 или 40 мл 33%-ного раствора NaOH (можно KOH) и сливают его через воронку в перегонную колбу. Количество вносимой щелочи зависит от объема серной кислоты, используемой для сжигания пробы. Сильно щелочную реакцию контролируют индикатором, для чего в перегонную колбу в процессе переноса пробы из колбы, в которой проводилось сжигание, добавляют несколько капель индикатора Ташира.

Включают колбонагреватель или нагреватель парообразователя (если прибор им снабжен) и начинают отгон пробы. При кипячении выделяется аммиак, который вместе с парами воды после прохождения через холодильник попадает в приемник и связывается с серной кислотой. Отгонку продолжают обычно 15—30 мин до нейтральной реакции, что проверяют индикаторной бумажкой.

Содержимое приемной колбочки титруют 0,01 н. раствором едкого натра до перехода окраски от малиновой в зеленую.

Расчет количества общего азота в пробе проводят по формуле: $X=(A-Б)\ 0{,}14\cdot100$, где X — количество (мг) общего азота в 100 мл рубцовой жидкости; A — количество (мл) 0,01 н. раствора серной кислоты, налитой в приемник; $Б$ — количество (мл) 0,01 н. едкого натра, пошедшего на титрование; 0,14 — количество (мг) азота, которое связывается 1 мл 0,01 н. раствора серной кислоты.

Если азот определяют в навеске пробы содержимого рубца, то расчет проводят по той же формуле, только полученный результат делят на массу навески в мг (H).

Пример: в приемную колбочку налито 10 мл 0,01 н. раствора серной кислоты. На титрование пробы пошло 1,2 мл 0,01 н. раствора NaOH. $X=(10-1{,}2)\cdot0{,}14\cdot100=123{,}2$ мг%. Следовательно, концентрация общего азота в данной пробе 123,2 мг%.

Ряд авторов вместо серной кислоты при отгонке аммиака в приемную колбу рекомендуют наливать не серную, а борную кислоту (20—30 мл 2% ного раствора борной кислоты) и определять аммиак прямым титрованием 0,1 н или 0,01 н. раствором серной кислоты. При взаимодействии борной кислоты с аммиаком образуется сильнодиссоциированный борат аммония: $NH_3+H_3BO_3 \rightarrow NH_4^+ + H_2BO_3^-$. При добавлении к образцу минеральной кислоты (например, серной) из иона $H_2BO_3^-$ находящегося в растворе, вновь образуется недиссоциирующая кислота: $H_2BO_3^- + H^+ \longrightarrow H_3BO_3$. Это позволяет определить аммиак прямым титрованием пробы 0,01 н. раствором кислоты до перехода окраски от зеленой в малиновую при использовании индикатора Ташира. Содержание азота в пробе вычисляют путем умножения количества миллилитров 0,01 н. серной кислоты, пошедшей на титрование, на 0,14 и на 100.

Следует иметь в виду, что расхождение результатов параллельных определений не должно превышать 2—3% относительно полученных величин.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕБЕЛКОВОГО (ОСТАТОЧНОГО) АЗОТА

Определение небелкового азота в рубцовой жидкости проводят по методу Кьельдаля. Предварительно необходимо провести осаждение белков. Для этого лучше использовать способ осаждения солями тяжелых металлов по Ро и Реду. Правда, в некоторых руководствах рекомендуют применять раствор трихлоруксусной кислоты (по аналогии с осаждением белков в крови или других биологических субстратах). Однако эта кислота недостаточно полно осаждает растительные белки и полипептиды.

Реактивы и оборудование. 0,3 н. (0,15 моль/л) раствор $Ba(OH)_2$ [можно [illegible] (0,3 моль/л) раствор NaOH]; 5%-ный раствор $ZnSO_4$; индикатор — фенолфталеин; центрифужные пробирки; центрифуга. Остальное оборудование и реактивы те же, что и при определении общего азота.

Ход определения. Предварительно важно правильно приготовить осадители. Оба раствора [0,3 н. $Ba(OH)_2$ и 5%-ный раствор $ZnSO_4$] должны точно нейтрализовать друг друга по фенолфталеину — объем на объем.

Осаждение белков: в центрифужную пробирку наливают определенный объем рубцовой жидкости (например, 2 мл), сюда же добавляют такой же объем [illegible] бария и аналогичный объем сернокислого цинка. Смесь тщательно смешивают и центрифугируют 15 мин при 3000—5000 об/мин.

Затем 3 мл центрифугата, что соответствует 1 мл рубцовой жидкости, переносят в колбу Кьельдаля, заливают 3 мл концентрированной серной кислоты. Сжигание пробы и отгонка аммиака проводятся точно так же, как и при определении общего азота. Учитывая, что концентрация небелкового азота в содержимом рубца жвачных обычно не превышает 60 мг%, в приемную колбочку достаточно налить 10 мл 0,01 н. раствора серной кислоты.

Расчет содержания небелкового азота в пробе проводится, так же как и общего азота, по формуле: $X=(A-Б)\cdot 0{,}14\cdot 100$, где X — концентрация небелкового азота (мг%) или мг в 100 мл.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВОГО АЗОТА

Белковый азот в содержимом рубца можно определить прямым способом по методу Барнштейна при осаждении белков солями тяжелых металлов. Однако чаще всего белковый азот определяют по разнице общего и небелкового азота.

Например, установлено, что концентрация общего азота рубцовой жидкости составляет 123,2 мг%, небелкового азота — 30,8 мг%. Следовательно, концентрация белкового азота в рубцовой жидкости будет равна 123,2—30,8=92,4.

Источники: 58, 60, 61, 67, 88, 104.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИТРАТОВ И НИТРИТОВ В РУБЦОВОЙ ЖИДКОСТИ

Среди небелковых азотистых веществ большое значение в питании животных имеют соли азотной и азотистой кислот — нитраты и нитриты. Вносимые в почву в качестве азотных удобрений, нитраты в обычных условиях последовательно восстанавливаются в растениях до нитритов и аммиака и используются в последующем для синтеза аминокислот и растительного белка. Промежуточные продукты восстановления нитратов — нитриты в большом количестве накапливаются только в растениях отдельных видов и при определенных условиях. На интенсивность их превращения в растительных клетках влияют такие факторы, как засуха, гербициды, отсутствие микроэлементов, в частности молибдена, являющегося составной частью фермента нитратредуктазы, восстанавливающего нитраты до нитритов. Особенно много нитратов накапливается в растениях при внесении в почву больших доз (свыше 200—300 кг азота на 1 га) азотных удобрений и при наличии неблагоприятных условий, таких как засуха, поражение растений листовой ржавчиной. В основном нитраты содержатся в стеблях кукурузы, в корнеплодах, особенно свекле, зеленой массе овса, пшеницы, ржи и многих сорных растений. Уровень накопления нитратов зависит от стадии вегетации растений, а также от обработки злаковых, свеклы и кукурузы некоторыми гербицидами.

Поступающие с растениями нитраты в рубце также последовательно превращаются до нитритов и аммиака. Токсичность нитратов зависит от скорости превращения их в более ядовитые нитриты. При скармливании животным кормов с повышенным содержанием нитратов последние восстанавливаются до нитритов быстрее, чем до аммиака. Поэтому на данной стадии в рубце скапливается избыточное количество нитритов, которые, всасываясь в кровь, ведут

к быстрому образованию метгемоглобина. При увеличении концентрации метгемоглобина до 60% животное погибает. (В норме у животного в крови содержится около 1—2% метгемоглобина от общего гемоглобина крови.) При длительном употреблении кормов, богатых нитратами, у жвачных возможны аборты, снижение молочной продуктивности, задержка роста. Избыточное накопление в рубце нитритов предотвращается введением в рацион кормов, богатых легкорастворимыми сахарами.

По данным лаборатории пищеварения ВНИИФБиП сельскохозяйственных животных, при обычных условиях кормления в рубце овец после 12—14-часового голодания нитратного азота содержится 0,012—0,03 мг%, а нитритного — 0,005—0,007 мг%. После кормления эти цифры увеличиваются до 0,09 и 0,008 мг%. У коров в рубцовой жидкости азота нитрата бывает от 0,017 до 0,054 мг%, а азота нитрита — до 0,016 мг%. В настоящее время токсическая дозой нитратного азота считается 0,21—0,52% в сухом веществе корма. Для коровы массой 500 кг токсической дозой может быть 90—110 г азота нитратов. Нитраты и нитриты в рубцовой жидкости жвачных необходимо определять при дифференциальной диагностике отравлений крупного рогатого скота и овец. Рекомендуется метод, описанный В. И. Соловьевым с сотр. (1961) и модифицированный в лаборатории пищеварения ВНИИФБиП сельскохозяйственных животных Н. Д. Мысником.

Принцип метода основан на реакции Грисса, по которой при взаимодействии реактива Грисса с ионами NO_2 образуется окрашенный раствор, интенсивность последнего зависит от концентрации нитритов. Вначале определяют количество нитритов. Затем их удаляют, а оставшийся раствор пропускают через порошок кадмия, восстанавливающий нитраты до нитритов. По количеству последних находят количество нитратов.

Реактивы. 1. Чистый металлический порошок кадмия.

2. 0,1 н. (0,1 моль/л) раствор соляной кислоты.

3. 0,3 н. (0,15 моль/л) раствор $Ba(OH)_2$.

4. 5%-ный раствор сернокислого цинка.

5. 5%-ный раствор аммиака.

6. 5%-ный раствор соляной кислоты.

7. Этиловый спирт 96%-ный.

8. Сульфаниловая кислота.

9. Альфа-нафтиламин.

10. Реактив Грисса состоит из равных объемов двух приготовленных растворов: 1) 0,5 г сульфаниловой кислоты растворяют в 150 мл 12%-ного раствора уксусной кислоты; 2) смешивают 180 мл 12%-ного раствора уксусной кислоты с фильтратом водного раствора альфа-нафтиламина, полученного при кипячении 0,2 г последнего в 20 мл дистиллированной воды. Хранят эти растворы в темном месте, а перед употреблением готовят реактив Грисса.

Оборудование. Фотоэлектрофотоколориметр; редукционные колонки; мерные колбочки на 100 мл; центрифуга и центрифужные пробирки.

Ход определения. Редукционную колонку с поперечным сечением 7 мм, имеющую снизу пришлифованный край и сверху воронкообразное расширение, подготавливают соответствующим образом. Нижнюю часть ее над краном прикрывают тонким слоем ваты, наливают дистиллированную воду и насыпают слой (12—15 см) металлического кадмия, который предварительно просеивают через сито с диаметром отверстий 1 мм и отмучивают в дистиллированной воде. Перед работой колонку промывают порциями по 15 мл сначала 0,1 н. соляной кислотой, затем дистиллированной водой и, наконец, 5%-ным раствором аммиака. Чтобы в колонку не попадал воздух, верхний слой кадмия должен всегда находиться под жидкостью. Активность кадмия периодически проверяют при помощи стандартного раствора азотнокислого натрия или азотнокислого калия. Для восстановления активности его извлекают из колонки и промывают 5%-ным раствором соляной кислоты.

Проводят осаждение белков рубцовой жидкости методом Ро и Рейса солями тяжелых металлов — 0,3 н. $Ba(OH)_2$ и 5%-ной $ZnSO_4$, как при определении небелкового азота. 20 мл полученного центрифугата переносят в 100-миллилитровую мерную колбу, куда последовательно добавляют 5 мл 5%-ного раствора аммиака, 10 мл 0,1 н. раствора соляной кислоты и объем доводят до метки дистил

[illegible]ованной водой. Из полученного раствора берут 15 мл и смешивают с 15 мл [illegible]тива Грисса. Через 15 мин измеряют интенсивность его окрашивания на [illegible]трофотоколориметре при зеленом фильтре в 20-миллиметровой кювете. По по[illegible]ниям экстинкции с помощью калибровочной кривой вычисляют содержание [illegible] в данном растворе.

Калибровочную кривую строят по стандартному раствору нитрита натрия ([illegible]стокислого натрия $NaNO_2$) с концентрацией нитрита от 0,1 до 1 мкг в 1 мл.

Количество нитритов в 100 мл рубцовой жидкости определяют по формуле: [illegible] 1500, где X — количество нитритов в 100 мл рубцовой жидкости; E — по[illegible]ель количества нитритов в 1 мл, соответствующих полученной экстинкции; [illegible] — произведение 15·100, где 15 — число, на которое умножают количество [illegible]ой жидкости, содержащейся в 20 мл безбелкового фильтрата, чтобы при[illegible] к 100 мл рубцовой жидкости; 100 — число, на которое необходимо умно[illegible] количество нитритов, найденное по калибровочной кривой (E), чтобы опре[illegible], сколько нитритов содержится в 20 мл безбелкового фильтрата.

В том случае, если показатель экстинкции выше диапазона калибровочной [illegible], полученный безбелковый фильтрат разводят определенным количеством [illegible]иллированной воды и при соответствующих расчетах учитывают степень раз[illegible]ения фильтрата. Формула определения количества нитритов в этом случае [illegible]: $X = E \cdot 1500 \cdot P$, где P — степень разведения фильтрата.

Для определения нитратов 20 мл безбелкового фильтрата переносят в кони[illegible]ую колбу, добавляют 5 мл этилового спирта, 10 мл 0,1 н. соляной кислоты [illegible] кипятят под тягой в водяной бане 15 мин. Затем добавляют 4 мл 5%-ного [illegible]твора аммиака и полученную жидкость пропускают через подготовленную ре[illegible]ционную колонку с постоянной скоростью фильтрации (около 5 мл в 1 мин). [illegible] колонке подключают водоструйный насос. При этом имеющиеся в пробе нитра[illegible] восстанавливаются до нитритов.

После пропускания раствора редукционную колбу промывают горячей водой [illegible] получения 70—80 мл фильтрата, который после охлаждения переносят в мер[illegible] колбочку на 100 мл и объем доводят до метки.

Для колориметрирования берут 15 мл раствора и добавляют 15 мл реактива [illegible]рисса. Смешивают оба раствора и через 15 мин определяют величину экс[illegible]инкции. Вычисление количества нитратов проводят по вышеприведенным фор[illegible]улам, умножая количество нитритов на коэффициент 1,23 для нитрата натрия и [illegible] — для нитрата калия.

В лаборатории часто приходится определять не количество нитратов, а со[illegible]ржание нитратного и нитритного азота. При этом конечные результаты не ум[illegible]ают на указанные коэффициенты, так как количество азота как в нитрите, так [illegible] в нитрате одинаково. В этом случае расчет нитратного и нитритного азота про[illegible]ит по формулам определения количества нитритов, умножая полученный ре[illegible]ультат на постоянную величину 0,203, показывающую содержание азота в нит[illegible]е натрия (20,3%).

Источники: 61, 118.

МЕТОДЫ ПОДСЧЕТА МИКРООРГАНИЗМОВ В СОДЕРЖИМОМ РУБЦА

В рубце жвачных обитает огромное количество разнообразных микроорганиз[illegible] — бактерий и простейших. Благодаря их активной деятельности питательные [illegible]ества корма подвергаются сложным превращениям, в результате чего образу[illegible]ся летучие жирные кислоты, аммиак, аминокислоты, используемые организмом [illegible] процессах обмена. Наряду с превращением составных компонентов корма в [illegible]единения, доступные для усвоения в преджелудках, происходит синтез жизнен[illegible]но важных аминокислот, витаминов. Поступая в нижележащие отделы пищева[illegible]тельного канала, бактерии и простейшие перевариваются и обеспечивают орга[illegible]ом высокоценным белком.

Развитию обильной по численности и разнообразной по составу микрофлоры [illegible] микрофауны способствуют определенные, благоприятные условия среды в этом [illegible]ане и в том числе pH содержимого, постоянный ионный состав, постоянное

снабжение микроорганизмов питательной средой, анаэробные факторы. Ба[illegible] и простейшие очень реагируют на изменение кормления и содержания. Н[illegible]мер, количество простейших — инфузорий увеличивается при включении в р[illegible] достаточного количества сена, концентратов, углеводистых кормов. Если в р[illegible]нах преобладает силос, простейших становится меньше, изменяется их ви[illegible] состав. Почти полностью они исчезают при голодании, а также при патолог[illegible]ком состоянии преджелудков, атонии, вздутии рубца, травматическом рети[illegible] перитоните. Некоторые исследователи показатель численности простейших [illegible]ют своеобразным «зеркалом» состояния рубцового пищеварения.

В нормальных условиях кормления и содержания животных в 1 мл руб[illegible] жидкости обычно содержится 10^8—10^{10} бактериальных клеток и от 200 [illegible] 1800 тыс. инфузорий (приложение 13).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ИНФУЗОРИЙ В СОДЕРЖИМОМ РУБЦА

Состояние микрофлоры в рубце обычно характеризуется видовым сост[illegible] инфузорий и их количеством.

В рубце жвачных находят до 100 видов инфузорий. По существующей [illegible]сификации инфузории класса Ciliata составляют две большие группы: подкл[illegible] Holotricha и подкласс Spirotricha. Инфузории первой группы равноресничные, [illegible]есть поверхность их тела равномерно покрыта ресничками. Отдельные виды [illegible] различаются по форме и размерам тела. Наиболее часто встречающиеся инфу[illegible]рии вида Isotrica ruminantum достигают размеров 130×67 мкм.

Классификация инфузорий подкласса Spirotricha — малоресничных основ[illegible] на характере строения ядерного аппарата, скелетных пластинок, расположе[illegible] ресничного аппарата, представленного в виде аборальной и спинной мембра[illegible] и устройства заднего конца тела. Большинство инфузорий этого подкласса пр[illegible]ставлено семейством. Ophryoscolecidae, из которого чаще всего в рубце жвачн[illegible] встречаются инфузории из родов Entodinium, Diplodinium, Epidinium, Ophryo[illegible]lex. Представители рода Entodinium — более мелкие (30×40 мкм), они преобл[illegible]дают в рубце — 60—80% всего состава инфузорий. На долю рода Diplodinium [illegible] приходится 14—24%, Epidinium — 1—3% и рода Ophryoscolex — 5—8%. Разм[illegible]ры тела последних двух родов наиболее крупные (130—150×50—80 мкм). Вид[illegible] рода Ophryoscolex обычно имеют на заднем конце тела много шипов.

Наличие в рубце большого количества инфузорий многообразных форм [illegible]детельствует о нормальном и эффективном течении ферментативных процессов [illegible] рубце. При нарушениях рубцового пищеварения видовой состав простейших в [illegible]новном представлен родом Entodinium. Наиболее чувствительны к изменени[illegible] среды в рубце крупные инфузории. Они в первую очередь исчезают при неблаг[illegible]приятных условиях их обитания в рубце и в последнюю очередь появляются пр[illegible] нормализации процессов.

Микроскопические исследования и подсчет простейших. Видовой состав пр[illegible]стейших определяют только в свежем содержимом рубца. Каплю его помещ[illegible] на предметное стекло, покрывают покровным и рассматривают под микроскоп[illegible] вначале при малом увеличении (окуляр ×7, объектив ×10), затем при больш[illegible] увеличении (объектив ×40), при несколько затененной диафрагме. Поскольк[illegible] инфузории, особенно крупные, при комнатной температуре быстро теряют по[illegible]вижность, то можно пользоваться нагревательным столиком, создавая в нем те[illegible]пературу 38—39°С. Для более детального определения строения тела инфузори[illegible] препарат лучше окрасить люголевским раствором или приготовить окрашенн[illegible] мазок и просматривать его под большим увеличением или иммерсией. Последн[illegible] способ можно использовать и для определения процентного отношения различн[illegible] видов инфузорий по принципу подсчета лейкограммы в камере Горяева.

Взятую пробу рубцового содержимого процеживают через 4 слоя марли [illegible] чтобы прекратить лизис клеток, консервируют 10%-ным водным раствором фо[illegible]малина из расчета 4—5 капель на пробирку. Можно сразу отмерить определе[illegible]ный объем рубцовой жидкости, например 5 мл, и добавить к нему такой [illegible] объем 4%-ного водного раствора формалина. Законсервированные формалин[illegible] пробы хранятся длительное время.

Перед определением рубцовую жидкость тщательно встряхивают. Если предварительно было сделано разведение, то сразу же ею заряжают счетную камеру. Гораздо чаще всего (особенно в хозяйствах) проводят только консервирование пробы, а последующее разведение ее и анализ ведут в лаборатории. В этом случае пробу перед анализом следует тщательно перемешать, так как инфузории быстро оседают на дно или фиксируются на грубых частицах корма. Пипеткой в 1—2 мл, лучше с чуть отбитым кончиком, отбирают определенный объем рубцовой жидкости. Этой же пипеткой, предварительно обтерев ее наружную сторону, набирают такой же объем дистиллированной воды и смесь тщательно перемешивают. Полученной смесью быстро заполняют счетную камеру.

Подготовка счетной камеры, внесение в нее анализируемой смеси и метод подсчета простейших в принципе не отличаются от техники, используемой для подсчета лейкоцитов крови.

Подсчитывают инфузорий в 100 больших квадратах при малом увеличении микроскопа. Для получения сопоставимых данных желательно провести подсчет в 300 больших квадратах, то есть зарядить и исследовать три камеры. Численность инфузорий определяют по формуле:

$$X = \frac{a \cdot 250 \cdot б}{100},$$

где X — количество инфузорий в 1 мкл рубцовой жидкости; a — количество инфузорий в 100 больших квадратах; $б$ — разведение рубцовой жидкости; объем большого квадрата $\frac{1}{250}$ мкл.

Учитывая, что разведение рубцовой жидкости было в 2 раза, то формула расчета может быть упрощена: $X = a \cdot 5$.

Чаще всего количество простейших выражают не на 1 мкл, а на 1 мл. Для этого полученное число инфузорий умножают на 1000.

Пример. При анализе рубцовой жидкости коровы при подсчете в трех камерах оказалось 152,148 и 159 инфузорий, или в среднем 153 инфузории в 100 больших квадратах: $153 \cdot 5 \cdot 1000 = 765$ тыс. Следовательно, в 1 мл рубцовой жидкости содержится 765 тыс. инфузорий.

МЕТОД ПОДСЧЕТА БАКТЕРИЙ ПОД МИКРОСКОПОМ

Подсчет числа бактерий в содержимом рубца обычно проводят по методу Грина. В настоящее время существует несколько его модификаций. Наиболее широкое распространение получил метод, описанный в книге Э. М. Фостера и др. «Микробиология молока с некоторыми модификациями» (1961).

Оборудование и реактивы. Микроскоп; микропипетки; физиологический раствор.

Ход определения. Вначале рубцовую жидкость разводят стерильным физиологическим раствором из расчета 1 : 1000. Микропипеткой отмеривают 0,01 мл рубцовой жидкости и профламбированной иглой размазывают мазок на площади предметного стекла, равной 1 см². Обычно делают 3—4 мазка. Мазок высушивают, фиксируют над пламенем горелки и окрашивают по Граму. Готовый мазок исследуют под иммерсионной системой. Подсчитывают бактерии в определенном количестве типичных полей зрения. В связи с тем что мазок не всегда получается равномерным, поля для подсчета следует брать по всему мазку, а лучше по диагонали. При этом в каждом мазке подсчитывают не менее 10 полей зрения и выводят среднее для одного поля.

Чтобы установить общее количество бактерий во всем мазке, уточняют площадь поля зрения микроскопа. Так как площадь круга равна πr^2, необходимо иметь данные о диаметре поля (в мм), который измеряют с помощью объектмикрометра. Площадь мазка 100 мм², деленная на площадь зрения под микроскопом, равняется количеству полей зрения в мазке. Поскольку мазок приготовлен из 0,01 мл жидкости, количество полей зрения в мазке, умноженное на 100, дает количество полей в 1 мл рубцовой жидкости, разведенной до 10^3. Все эти арифме-

тические вычисления объединяют формулой: 10 000 : 3,1417 (r^2) = коэффиц на который надо умножить среднее количество клеток в поле зрения микроск

Таким образом, подсчитав нужное количество полей зрения (по 10 поле трех мазках), суммируют общее количество бактерий и вычисляют среднее кол чество бактерий в одном поле зрения. Полученное число умножают на коэфф циент и степень разведения. До тех пор, пока объектив, положение тубуса и ок ляра микроскопа не меняются, коэффициент остается постоянным.

Пример. Определяем коэффициент. Диаметр поля зрения микроск 0,132 мм; следовательно, радиус его — 0,066 мм, а r^2 будет составлять 0,001

$$\frac{10\,000}{3,1416 \cdot 0,004356} = \frac{10\,000}{0,0137}.$$

Подсчитав 30 полей зрения (по 10 в трех мазках), определили, что в пол зрения в среднем насчитывается 15 микробных клеток. Следовательно:

$$\frac{15 \cdot 10\,000}{0,0137} \cdot 1000 = 10,9 \text{ млрд.}, \text{ или } 10,9^9 \text{ микробных клеток в 1 мл рубц}$$

жидкости.

Источники: 35, 125.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЖЕЛУДОЧНОГО СОДЕРЖИМОГО

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ КОНСТАНТЫ ЖЕЛУДОЧНОГО СОДЕРЖИМОГО У ЖИВОТНЫХ

При диагностике желудочно-кишечных заболеваний исследуют физические, химические свойства и микроскопический состав желудочного содержимого, определяют характер секреции в желудке, устанавливают нарушения процессов пищеварения в нем.

Методы исследования функционального состояния желудка делят на две группы: зондовые и беззондовые. Зондовое исследование считается пока основным методом клинического изучения секреторной функции желудка. Данное исследование складывается из нескольких последовательных этапов: 1) извлечение содержимого желудка с использованием энтеральных или парентеральных стимуляторов желудочной секреции; 2) определение объема и кислотности желудочного содержимого; 3) определение протеолитической активности желудочного содержимого.

Для характеристики истинного состояния секреторной функции желудка обязательным является тщательное проведение всех этапов исследования.

Весьма ценными функциональными показателями секреторной деятельности слизистой оболочки желудка считают высоту и динамику кислотности, наличие свободной и связанной соляной кислоты.

Физиологические константы желудочного содержимого у здоровых животных представлены в таблице 29.

Нормативные величины основных показателей желудочного содержимого и желудочного сока у взрослых животных натощак

Вид животных	Величина pH		Общая кислотность желудочного содержимого (титр. ед.)	Соляная кислота желудочного содержимого (титр. ед		Перевариваю-щая сила желудочного содержимого по Метту (мм)	Желудочный лейкопедез содержимого (в 1 мкл)
	желудочного сока	желудочного содержимого		свободная	связанная		
Крупный рогатый скот	1,4 — 3,9	—	15 — 35	7 — 20	5 — 15	Ферментативная активность (3 — 5 мин — обесцвечивание метиленовой сини)	
Свиньи	1,3 — 1,7	1,9 — 4,0	24 — 36	20 — 28	12 — 26	2,2 — 6,9	180 — 250
Овцы	1,1 — 2,0	1,8 — 4,5	30 — 60	10 — 30	10 — 20	1,5 — 5,6	115 — 400
Лошади	0,8 — 1,2	1,7 — 3,5	35 — 70	14 — 36	15 — 30	1,8 — 4,7	29 — 179

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ СОДЕРЖИМОГО ЖЕЛУДКА, ПОДГОТОВКА ПРОБ К АНАЛИЗУ

Желудочное содержимое получают в помощью специальных резиновых зондов. В ветеринарной клинической практике широко используют одномоментный способ извлечения желудочного содержимого толстым зондом. При этом данное содержимое получают или натощак, или после пробного раздражителя. Для пробуждения желудочной секреции предложены различные раздражители (энтеральные, вводимые через рот в виде пробных завтраков, и парентеральные, вводимые в организм подкожно или внутримышечно). В качестве энтеральных пробных раздражителей лошадям рекомендуют задавать 500 г овсяной муки в 3 л воды или 1 л 5%-ного этилового спирта. Подсвинкам дают 50 г хлеба и 400 мл воды или такое же количество болтушки из отрубей. Собакам назначают 400 мл мясного бульона или 100 мл 5%-ного этилового спирта, а пушным зверям — 50 мл 5%-ного этилового спирта.

Из парентеральных раздражителей используют гистамина гидрохлорид 0,1%-ный его раствор вводят подкожно в дозе 0,018 мг/кг. При появлении побочных явлений внутримышечно вводят 1—3 мл 2%-ного раствора димедрола. В последнее время для стимуляции желудочной секреции применяют пентагастрин (4—6 мкг/кг).

Для более полной оценки функционального состояния желудочных желез изучают содержимое желудка натощак (натощак — базальная секреция — 1-я порция, которая дает представление о секреции, обусловленной механическим раздражением слизистой оболочки желудка зондом). После получения этой порции вводят пробные раздражители (энтерально) и через 20—25 мин аспирируют из желудка все содержимое (2-я порция). Затем в течение часа аспирируют сок через каждые 15 мин в отдельные банки (3-я, 4-я, 5-я и 6-я порции).

При использовании парентерального раздражителя сразу же в течение часа через каждые 15 мин берут четыре порции желудочного содержимого. При этом получают данные о стимулированной (последовательной) секреции (II фаза) вызванной химическим раздражением слизистой оболочки желудка пробными раздражителями. Схема исследования представлена на рисунке 11.

Таким образом, взятие желудочного содержимого через определенные промежутки времени, то есть в динамике, дает возможность составить определенное представление о характере секреции в межпищеварительном и пищеварительном периодах. Перед употреблением зонды дезинфицируют, чаще денатурированным спиртом.

Извлечение и исследование желудочного содержимого осуществляют после 12—16-часовой голодной диеты (утренние часы).

Взятие желудочного содержимого у лошади. Лошадей при зондировании не фиксируют. Зонд для лошадей представляет собой эластичную резиновую трубку длиной 160—225 см, с наружным диаметром 18 мм и внутренним просветом 12—14 мм. Вводят его через носовые ходы. Перед введением зонд проверяют на проходимость по нему воды, дезинфицируют и затем смазывают вазелином. Для определения местонахождения зонда на нем можно сделать пометки. Первая по-

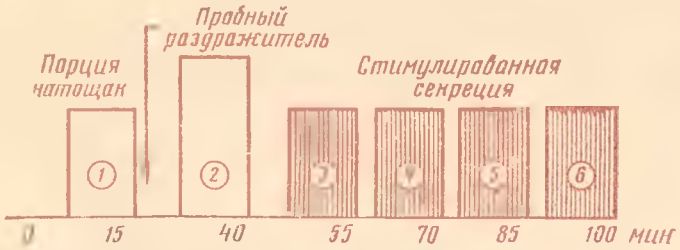


Рис. 11. Схема исследования желудочного содержимого (цифры соответствуют номерам порций).

метка — показатель расстояния от крыла носа до глотки (это расстояние измеряется зондом непосредственно на голове животного), вторая — примерное расстояние от носового отверстия до желудка (15—16-е ребро слева).

Вводимый конец берут пальцами левой или правой руки, в зависимости от того, в какую ноздрю вводят зонд, а свободный конец поддерживает помощник. При введении в левую ноздрю помощник и оператор стоят справа. Не следует стоять впереди животного во избежание ушибов. В момент введения ладонью левой руки надавливают на стенку носа, средним пальцем этой же руки приподнимают ноздрю, а указательным пальцем направляют конец зонда в нижний носовой ход, продвигая осторожно в носовую полость, а затем и до глотки, где зонд встречает незначительное сопротивление. В дальнейшем для проведения зонда в пищевод необходимо использовать акт глотания, который появляется вскоре после соприкосновения зонда со слизистой оболочкой глотки.

При отсутствии акта глотания его можно вызвать специально, проводя различные манипуляции (опускание головы вниз, вытягивание языка, раскрытие рта помощником и т. д.). После попадания зонда в пищевод ощущается некоторое затруднение его продвижения вследствие сдавливания стенками пищевода (при попадании зонда в трахею движение его проходит свободно, без должного сопротивления). В дальнейшем зонд продвигается до желудка, что определяют по метке, нанесенной на зонде. Убедившись, что зонд находится в желудке, свободный конец фиксируют.

Как правило, если зонд введен правильно и находится в желудке, содержимое под влиянием внутрибрюшинного давления поступает в зонд и вытекает в приготовленный сосуд через наружное отверстие. Извлечение желудочного содержимого проводят по схеме (см. рис. 11) по методу Клейнбока с помощью специальной установки (аппарат, предложенный А. М. Смирновым), насоса Комовского и других электровакуумных приборов.

Для сбора извлекаемого желудочного содержимого используют широкогорлую бутыль с двумя стеклянными трубками в пробке. Через одну стеклянную трубку бутыль соединяют при помощи резиновой трубки с зондом, а через другую из нее откачивают воздух.

Взятие желудочного содержимого у свиней. Свиньям зонд вводят через ротовую полость посредством зевника с центральным отверстием, направляя его по верхнему нёбу.

Для взрослых свиней (свиноматок) используют зонд, предназначенный для лошадей, а также фиксационный деревянный зевник с круглым отверстием посредине, которое должно быть достаточным для беспрепятственного прохождения зонда, и двух боковых верхних продольных отверстий с тесьмой, или зевник металлический (И. Г. Шарабрин). Для поросят и подсвинков применяют зонды длиной 100 см, с диаметром просвета 13 мм, толщиной стенки 2 мм. При отсутствии специальных зондов пользуются медицинскими зондами или резиновыми трубками соответствующего диаметра. Эти трубки предварительно шлифуют наждачной бумагой и проделывают в них боковые отверстия.

Крупных свиней зондируют после фиксации в правом боковом положении или стоя, а поросят и подсвинков — на фиксационном деревянном столе.

Вставленный в рот зевник укрепляют капроновой тесьмой, которой охватывают обе челюсти и прочно завязывают в области затылка. Простерилизованный и смазанный вазелином зонд через отверстие зевника продвигают в сторону глотки, а затем в пищевод и желудок.

Содержимое желудка отсасывают шприцем объемом 100—200 мл или специальной вакуумной установкой. Если оно не вытекает, меняют положение зонда, вводя несколько глубже или вытягивая его немного обратно.

Взятие желудочного содержимого у собак и пушных зверей. Техника введения зонда у собак и пушных зверей та же, что и у поросят. В качестве зевника также используют латунную трубку длиной 10 см, с внутренним диаметром 16 мм, толщиной стенок 1,5 мм и двумя отверстиями на концах с капроновой тесьмой. На латунную трубку надета такой же длины резиновая трубка. Этим достигается укрепление зевника в ротовой полости с надежной иммобилизацией челюстей, а также предохраняется от травм слизистая оболочка и зубная аркада.

Взятие содержимого сычуга у новорожденных телят. При зондировании сычуга используют медицинский желудочный зонд № 8, 10, 12 (диаметр 6—9 мм)

или эластичную резиновую трубку длиной 105—115 см с оливой из пенопласта на конце вводят через носоглотку в пищевод. Когда конец зонда достигает шейной части пищевода, теленку дают из сосковой поилки теплую (37—38°С) жидкость (молозиво, молоко, воду или 1%-ный раствор хлорида натрия в количестве 200—300 мл) и в это время продвигают зонд в сычуг. Длина введенной части зонда составляет 75—90 см в зависимости от величины животного. На свободный конец зонда накладывают зажимы, а затем фиксируют его бинтом. Содержимое сычуга аспирируют с помощью шприца Жанэ.

Взятие желудочного содержимого из железистого желудка у птиц. Для этого пользуются зондом Л. М. Обукова из мягкой полиэтиленовой трубки, которая нетоксична и не окисляется желудочным содержимым. На конце трубки находится овальная головка с отверстиями. У фиксированной птицы шею слегка вытягивают и через ротовую полость по пищеводу зонд вводят в зоб. Затем пальцами левой руки конец зонда, находящийся в верхней части зоба, направляют в грудную часть пищевода и осторожно продвигают вперед до тех пор, пока конец зонда не будет в железистом желудке (до легкого упора). Желудочное содержимое может истекать произвольно либо его отсасывают шприцем. Наибольшее количество желудочного содержимого бывает в первый час после кормления птиц.

ВИЗУАЛЬНАЯ ОЦЕНКА СОДЕРЖИМОГО ЖЕЛУДКА

При оценке исследуемого содержимого желудка следует помнить о значительной индивидуальной вариабельности желудочного сокоотделения у здоровых животных. Характер секреции зависит от вида животного, его возраста, а также от примененного стимулятора желудочных желез. Интенсивность секреторной реакции желез тесно связана с характером пробного раздражителя. В основном можно считать, что секреторный ответ адекватен силе используемого стимулятора желудочных желез. В связи с этим в клинической практике для сравнительной оценки желудочного кислотообразования целесообразно применять единые как методы исследования, так и пробные раздражители (500 г овсяной муки с водой, 5%-ный этиловый спирт, гистамин, пентагастрин).

Увеличение количества и кислотности желудочного содержимого указывает на повышение секреторной деятельности — гиперсекрецию или гиперхилию желудка. У некоторых животных натощак резко увеличивается количество содержимого желудка. У отдельных лошадей можно откачать до 800 мл прозрачной жидкости кислого запаха. Установлено, что у больных животных, страдающих прикуской, в первый год желудочная секреция всегда усиленна. Гиперсекрецию в этом случае можно объяснить постоянным раздражением желез желудка воздухом и частичками дерева. У свиней, собак скопление большого количества газов в желудке также сопровождается гиперсекрецией.

Вместе с тем многолетним клиническим опытом установлены общепринятые положения о характере изменения желудочного кислотообразования при заболеваниях гастральной системы.

При остром гастрите, гиперкератозе, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки в большинстве случаев отмечают избыточное желудочное кислотовыделение и усиленную продукцию пепсиногена, обусловленные повышением тонуса блуждающего нерва. Значительно увеличивается кислотообразование в межпищеварительный период, особенно в ночное время. Чаще у животных натощак и после введения раздражителей выделяется мало желудочного содержимого, которое нередко состоит из одной слизи эндогенного характера и трудно откачивается; оно серо-белого цвета, тягучее, приторного или неприятного запаха, с высокой плотностью — 1,010—1,016.

Уменьшение количества желудочного содержимого указывает на понижение секреторной деятельности — гипосекрецию или гипохилию желудка.

Гипосекреция бывает у животных при однообразном, неполноценном в белково-витаминном отношении кормлении, изнурительной работе и во многих случаях при хронических катарах.

При хроническом гастрите, язвенной болезни и расширении желудка кислотообразование имеет выраженную тенденцию к снижению.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕАКЦИИ ЖЕЛУДОЧНОГО СОДЕРЖИМОГО

Реакцию желудочного содержимого определяют индикаторной бумажкой, pH метром.

Определение реакции желудочного содержимого с помощью индикаторной бумаги. *Принцип.* Соляная кислота буферного раствора воздействует на цвет индикатора, в результате чего краситель изменяет цвет бумаги (типа «Рнфан», «Реагент» и др.).

Ход определения. Полоску индикаторной бумаги смачивают исследуемым желудочным содержимым или соком и тотчас же сравнивают измененный цвет со шкалой.

Определение реакции желудочного содержимого pH-метром. *Принцип.* В основу электрометрического определения показателя водородных ионов положено измерение э.д.с. (электродвижущей силы) или разности потенциалов между электродами. При измерении pH широко пользуются стеклянным электродом.

Оборудование. pH-метр типа ЛПУ или универсальный иономер ЭВ-74; зонды резиновые; шприц на 150—200 мл, насос Комовского или отсасыватель хирургический (ОХ-10); химические стаканы на 100 и 500 мл; мерные цилиндры; воронки, быстрофильтрующая для грубых осадков фильтровальная бумага; штатив.

Ход определения. Порцию желудочного содержимого, полученного натощак и фракционно, необходимо фильтровать каждую в отдельности. В каждой порции определяют также и pH.

Желудочное содержимое наливают в стаканчик и погружают в него предварительно промытые дистиллированной водой и обсушенные фильтровальной бумагой электроды. При этом применяют автоматическую температурную компенсацию или при каждом измерении устанавливают указатель ручного корректора на температуру контролируемого желудочного содержимого. Для того чтобы погрузить электроды в раствор, необходимо: а) левой рукой отвести столик влево на 90°; б) взять стаканчик с раствором в правую руку и подставить его под электроды; в) левой рукой подвести столик под стаканчик.

Вначале переключатель пределов измерения устанавливают в положение 2—14 и показания отсчитывают по нижней шкале прибора — от 2 до 14 единиц pH (грубая прикидка). Затем работу ведут по верхней шкале на узких диапазонах измерений (4 единицы pH на всю шкалу прибора). Для этого переключатель пределов измерения ставят на нужный диапазон. Предположим, при грубой прикидке pH исследуемой порции желудочного содержимого находится около 7. Следовательно, для точного измерения pH переключатель пределов перемещают в положение IV (6—10). В этом случае нуль шкалы — это уже 6 единиц, а цифра 4 означает 10 единиц pH. Отсчет величины pH по шкале прибора следует производить после того (обычно через 1—2 мин), как показания примут установившееся значение. При снятии показаний стрелка и ее зеркальное отражение на шкале должны совпадать. Измерения возможны с точностью до 0,05 единицы pH. Показания pH вносят в специальный бланк.

При эксплуатации прибора не следует допускать высыхания стеклянного электрода, так как это может привести к изменению его характеристики. По окончании работы с прибором электроды оставляют погруженными в дистиллированную воду.

Клиническое значение. Как известно, соляная кислота, содержащаяся в желудке, является одним из активных химических участников пищеварительного гидролиза и в этом заключается ее основная роль с физиологической точки зрения. Она обеспечивает оптимум pH для ферментов желудка, участвует в гормональном возбуждении деятельности главных желез желудка и эндокринной секреции панкреатической железы, способствует набуханию белковых коллоидов пищи, тем самым подготавливая их к гидролитическому расщеплению, является одним из регуляторов моторики желудка и тонкой кишки, оказывает бактерицидное и бактериостатическое действие и т. д.

Определение химических свойств реакции желудочного содержимого гастральной системы в межпищеварительном и пищеварительном периодах дает возможность вскрыть характер нарушения деятельности слизистой оболочки в целом. Так, например, высокий уровень базальной секреции натощак и низкие величины

pH (1,7) межпищеварительного периода чаще всего свидетельствует о нарушении механизмов регуляции секреторного цикла. Низкие показатели величины pH в период активной секреторной работы желудочных желез (после пробных раздражителей) в высокой степени вероятности указывают на морфологические изменения тех или иных элементов гастральной системы.

Кислотность в желудочном содержимом и двенадцатиперстной кишки — своеобразный раздражитель для размыкания и замыкания сфинктера. От концентрации соляной кислоты в содержимом желудка зависит эвакуация химуса в двенадцатиперстную кишку. Наблюдения показывают, что при повышенной кислотности — pH 1—2,5 — желудка (кислый катар) эвакуация редкая, а при пониженной кислотности — величина pH 5,6—6,5 — или ахилии (щелочной катар желудка) сфинктер пилоруса вообще не закрывается. Отсюда возникают запоры или поносы у животных.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕЙ КИСЛОТНОСТИ, СВОБОДНОЙ И СВЯЗАННОЙ СОЛЯНОЙ КИСЛОТЫ ЖЕЛУДОЧНОГО СОДЕРЖИМОГО

Кислотность желудочного содержимого исследуют классическим методом титрования с использованием индикаторов, обладающих свойствами изменять свою окраску в определенной зоне pH среды. Наиболее удобным считается метод Тенфера, с помощью которого можно раздельно в двух порциях определить общую кислотность, свободную и связанную соляную кислоту.

Принцип. Желудочное или сычужное содержимое титруют 0,1 н. раствором едкого натра до нейтрализации субстрата. Об этом судят по изменению цвета соответствующих индикаторов.

Реактивы. 1%-ный спиртовой раствор фенолфталеина: 1 г фенолфталеина помещают в цилиндр на 100 мл и доливают до метки 96% этиловым спиртом, приготовленный реактив переливают в капельницу. Хранят при комнатной температуре.

2. 0,5%-ный спиртовой раствор 4-диметиламидоазобензола (метиловый желтый, диметиловый желтый); 0,5 г диметиламидоазобензола помещают в цилиндр на 100 мл и доливают до метки 96% этиловым спиртом. Приготовленный реактив переливают в капельницу. Хранят при комнатной температуре.

3. 0,1 н. (0,1 моль/л) раствор едкого натра готовят из фиксонала. Перед употреблением титр проверяют по 0,1 н. раствору соляной кислоты.

4. 1%-ный водный раствор ализаринового красного: 1 г реактива помещают в цилиндр на 100 мл и доливают дистиллированной водой до метки.

Оборудование. Микробюретки на 2 и 5 мл; колбы конические на 50 мл или стаканчики для титрования; пипетки вместимостью 5—10 мл.

Ход определения общей кислотности и свободной соляной кислоты. Исследуют две отдельные порции желудочного содержимого. В 1-й порции определяют свободную соляную кислоту и общую кислотность, во 2-й — связанную соляную кислоту.

Кислотность в 1-й порции желудочного содержимого определяют следующим образом. В стаканчик помещают 5 или 10 мл профильтрованного желудочного содержимого и сюда же приливают из капельницы сначала 1—2 капли 0,5%-ного раствора диметиламидоазобензола. В присутствии свободной соляной кислоты желудочное содержимое окрашивается в ярко-красный цвет, при небольшом содержании свободной соляной кислоты — в бледно-розовый; если же ее нет, то оно окрашивается в желтый или оранжевый цвет. Записав уровень 0,1 н. раствора едкого натра в микробюретке, начинают титровать желудочное содержимое до появления оранжевого или лимонно-желтого цвета (в этом случае свободная соляная кислота будет оттитрована). Количество израсходованной на титрование щелочи записывают и по первой цифре титрования рассчитывают свободную соляную кислоту. Затем в этот же раствор приливают из капельницы 1—2 капли 1%-ного фенолфталеина. Индикатор фенолфталеин не изменяет окраски желудочного содержимого, так как реагирует в момент перехода кислой реакции в щелочную при полной нейтрализации всех кислореагирующих веществ. Производят

торое титрование до появления стойкого розового окрашивания. Количество щелочи, пошедшее на титрование раствора, также записывают. Изменение его окраски свидетельствует об окончании данного титрования, и по второй цифре титрования определяют общую кислотность.

Кислотность желудочного содержимого определяют по количеству миллилитров 0,1 н. раствора едкого натра, пошедшего на титрование 100 мл желудочного содержимого (условные титрационные единицы). Так как для титрования берут 10 мл желудочного содержимого, а расчет ведут на 100 мл, то количество потраченной щелочи умножают на 20. Одна титрационная единица соответствует концентрации соляной кислоты, равной 1 мэкв/л (ммоль/л).

Пример расчета. 1. Взято 5 мл желудочного содержимого. Уровень 0,1 н. раствора щелочи установлен на делении 0. На первое титрование израсходовано 1 мл 0,1 н. щелочи, на второе — 2 мл. На 100 мл желудочного содержимого пошло 0,1 н. раствора щелочи в 20 раз больше: первое титрование 1×20=20 мл 0,1 н. раствора щелочи; второе титрование 2×20=40 мл 0,1 н. раствора щелочи.

Если на титрование 5 мл желудочного содержимого израсходовано 2 мл 0,1 н. раствора щелочи, то количество общей кислотности равно:

$$X = \frac{2 \cdot 100}{5} = 40 \text{ ммоль (ед.)},$$

где 2 — количество 0,1 н. раствора щелочи, мл; 5 — количество желудочного содержимого, взятого для титрования, мл; 100 — пересчет на 100 мл.

Ответ: свободная соляная кислота — 20 титр. ед. (20 ммоль/100 мл), общая кислотность — 40 титр. ед. (40 ммоль/100 мл). При титровании 10 мл желудочного содержимого полученные цифры умножают на 10.

Если после прибавления 0,5%-ного раствора диметиламидоазобензола желудочное содержимое сразу окрашивается в желтый цвет, то свободную соляную кислоту не определяют, а устанавливают лишь общую кислотность при добавлении к нему 1—2 капель 1%-ного раствора фенолфталеина, не изменяющего цвет. Желудочное содержимое титруют до появления стойкого розово-красного окрашивания.

Пример расчета. Для титрования взято 5 мл исследуемого желудочного содержимого. Исходный уровень 0,1 н. раствора щелочи в микробюретке у деления 0. Титрование заканчивают в момент появления стойкого розово-красного окрашивания, уровень 0,1 н. раствора щелочи в микробюретке у деления шкалы 0,5, 0,5×20=10 мл 0,1 н. раствора щелочи. Ответ: свободная соляная кислота — 0 титр. ед. (0 ммоль/100 мл), общая кислотность — 10 титр. ед. (10 ммоль/100 мл).

Ход определения связанной соляной кислоты. Для этого используют вторую порцию того же желудочного содержимого. Во второй стаканчик помещают 5 или 10 мл профильтрованного желудочного содержимого, прибавляют 1—2 капли 1%-ного водного раствора ализаринового красного, после чего желудочное содержимое окрашивается в желтый цвет. Установив и записав исходный уровень 0,1 н. раствора щелочи в микробюретке, титруют желудочное содержимое до фиолетового. Этот момент соответствует нейтрализации всех веществ кислой реакции, за исключением связанной соляной кислоты. Отмечают количество мл 0,1 н. раствора щелочи, израсходованного на титрование. Для определения показателя числа единиц связанной соляной кислоты из величины общей кислотности (получаемые при определении общей кислотности в 1-й порции по Тепферу) вычитаем результаты титрования с ализариновым красным (при пересчете на 100). При отсутствии связанной соляной кислоты от прибавления индикатора получается сразу фиолетовое окрашивание, а не желтое, как это бывает при положительной реакции.

Пример расчета. На титрование 5 мл исследуемого желудочного содержимого израсходовано 0,8 мл 0,1 н. раствора щелочи (исходный уровень щелочи — на делении 0). При установлении общей кислотности по методу Тепфера в 1-й порции израсходовано 2 мл 0,1 н. раствора щелочи, а во 2-й 0,8 мл. Количество мл щелочи, необходимой для нейтрализации связанной HCl, составит: 2—0,8=1,2 мл 0,1 н. раствора щелочи; 1,2·20=24 мл 0,1 н. раствора щелочи. Ответ: связанная соляная кислота — 24 титр. ед. (24 ммоль/100 мл).

Титрование с ализариновым красным особенно рекомендуется при отсутствии свободной соляной кислоты, ибо в таких случаях связанная соляная кислота может быть иногда и в норме, и повышенной.

Если во всех порциях желудочного содержимого отсутствует свободная соляная кислота, то определяют ее дефицит. Для этого к 5 мл профильтрованного желудочного содержимого прибавляют 2 капли 0,5%-ного раствора диметиламидоазобензола и титруют 0,1 н. раствором соляной кислоты до появления стойкого красного окрашивания. Расчет производят по формуле:

$$d = \frac{100 \cdot k}{V},$$

где d — дефицит соляной кислоты, ммоль/100 мл; k — количество 0,1 н. раствора соляной кислоты, пошедшей на титрование, мл; V — объем пробы, взятой для титрования, мл. Если на титрование 5 мл желудочного содержимого израсходовано 2 мл 0,1 н. раствора соляной кислоты, то ее дефицит равен $100 \cdot 2 : 5 = 40$ ммоль/100 мл.

Кислотность желудочного содержимого устанавливают отдельно в каждой порции. На основании полученных данных судят о состоянии желудочного кислотообразования в динамике. После определения в каждой порции желудочного содержимого объема, общей кислотности, свободной и связанной соляной кислоты вычисляют дебит соляной кислоты, то есть общее количество выделенной желудком соляной кислоты за тот или иной отрезок времени. Этот показатель позволяет комплексно оценивать количественный и качественный состав желудочной секреции. В последние годы вычисление дебита является неотъемлемой частью правильно выполненного исследования желудочной секреции.

Дебит соляной кислоты рассчитывают по формуле: $Д = V_1C_1 + V_2C_2 + V_3C_3 + V_4C_4$, где Д — дебит соляной кислоты, ммоль/ч; $V_1...V_4$ — объем отдельных 15-минутных порций желудочного содержимого, л; $C_1...C_4$ — содержание кислоты в отдельных 15-минутных порциях желудочного содержимого, ммоль/100 мл.

Дебит можно вычислить для свободной, связанной соляной кислоты и общей при стимулированной секреции (при расчете в формулу подставляют соответствующие данные).

Вычисление дебита соляной кислоты значительно упрощается при использовании номограмм.

Способы выражения кислотности желудочного содержимого. Кислотность характеризуется количеством миллилитров 0,1 н. раствора едкого натра, затраченным на титрование 100 мл желудочного содержимого, и выражается в титрационных единицах. Одна такая единица соответствует концентрации соляной кислоты, равной 1 мэкв/л или ммоль/л.

Расчет проводят по формуле:

$$X = \frac{100 \cdot A}{B},$$

где X — кислотность в титрационных единицах; A — количество 0,1 н. раствора едкого натра (в мл), израсходованного на титрование; B — количество (в мл) желудочного содержимого, взятого для данного определения.

В последние годы в гастроэнтерологии все более отчетливо проявляется тенденция к количественной характеристике секреторной функции желудка. Для более объективной оценки кислотообразующей функции в клинику введено понятие дебит-час, то есть количество соляной кислоты, выделившейся за 1 ч и выраженное в миллиэквивалентах или в ммолях. Дебит-час соляной кислоты в миллиэквивалентах (ммолях) рассчитывают по формуле: $Д = V_1E_1 \cdot 0{,}001 + V_2E_2 \cdot 0{,}001 + V_3E_3 \cdot 0{,}001 + ...$, где V — объем порции желудочного содержимого, мл; E — концентрация соляной кислоты в титрационных единицах в той же порции; 0,001 — количество миллиэквивалентов (ммоль) соляной кислоты в 1 мл исследуемого содержимого при концентрации ее, равной одной титрационной единице. Число слагаемых в формуле определяется тем, сколько порций желудочного содержимого получено за время исследования. Если рассчитывают дебит-час, то число слагаемых 4. Поскольку величина дебит-часа зависит от часового напряжения секреции и величины кислотности, то следует стремиться к наиболее полному извлечению желудочного содержимого.

Клиническое значение. При заболеваниях желудка кислотность может быть нулевой, пониженной и повышенной. При язвенной болезни желудка или гиперацидном гастрите происходит увеличение содержания свободной соляной кислоты и общей кислотности (гиперхлоргидрия). При гипацидном гастрите наблюдается уменьшение количества свободной соляной кислоты и общей кислотности (гипохлоргидрия). При хроническом гастрите соляная кислота полностью отсутствует и значительно снижается общая кислотность (ахлоргидрия). Количество желудочного сока уменьшается. Подобное наблюдают также при диффузном гастрите с преимущественным поражением обкладочных клеток желудка. При продольно-гнилостных процессах в желудке, кардиопилороспазме разница между цифрами общей кислотности и свободной соляной кислоты будет значительной. Наличие свободной соляной кислоты натощаковой порции, особенно в высоких концентрациях (30—60 титрационных единиц), встречается при остром гастрите, язвенной болезни желудка. У лошадей при язвенной болезни двенадцатиперстной кишки в большинстве случаев отмечают избыточное желудочное кислотовыделение и повышенную продукцию пепсиногена, что обусловлено повышением тонуса блуждающего нерва. Наличие пониженной или повышенной кислотности указывает на различные стадии воспалительного процесса слизистой оболочки желудка и должно рассматриваться как симптом гастрических заболеваний.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПЕПСИНА В ЖЕЛУДОЧНОМ СОДЕРЖИМОМ

Чтобы судить о секреторной функции желудка, наряду с определением кислотности желудочного содержимого необходимо иметь представление о пепсинообразующей функции желудка, как основном показателе работы главных желез.

Для установления протеолитической активности желудочного содержимого предложен ряд методов. Все они основаны на принципе определения протеолитической активности протеиназ. Наиболее распространенными субстратами для протеиназ являются белки: казеин, гемоглобин, сухая плазма и др. С их помощью выявляют активность какой-либо одной протеиназы или общую протеолитическую активность (например, при исследовании желудочного сока). Если же биологическая жидкость содержит несколько протеиназ, а перед исследователем стоит задача их дифференцированного определения, то для каждой протеиназы используют специфичные субстраты.

Во многих странах чаще используют классический метод М. Л. Ансона и А. Е. Мирску (1932), основанный на способности пепсина в определенных условиях расщеплять белковую молекулу гемоглобина с освобождением тирозина и триптофана. По концентрации последних и судят о пептической активности того или иного биологического субстрата.

У нас в стране довольно широко применяют этот метод в модификации М. П. Черникова. Он прост в исполнении, дает хорошо воспроизводимые результаты. Но для работы необходим гемоглобин, получение которого в настоящее время является еще труднодоступным. Однако мы даем описание этого метода как наиболее точного.

Для ветеринарных лабораторий предложен метод определения активности пепсина по В. Н. Туголукову. Он несколько менее точен, но не требует дефицитных реактивов и дорогостоящей аппаратуры.

Определение активности пепсина в желудочном содержимом с использованием в качестве субстрата сухой плазмы (метод В. Н. Туголукова). *Принцип.* Метод основан на расщеплении пепсином, содержащимся в желудочном соке, субстрата — сухой плазмы; об активности пепсина судят по количеству нерасщепившегося субстрата, осаждаемого трихлоруксусной кислотой.

Реактивы. 1. 2%-ный раствор сухой плазмы: 2 г сухой плазмы вносят в цилиндр на 100 мл, растворяют в 60—70 мл 0,1 н. раствора соляной кислоты (готовят из фиксанала) и доводят этим же раствором до метки.

2. 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты: 10 г трихлоруксусной кислоты растворяют в 90 мл дистиллированной воды.

Оборудование. Пробирки центрифужные, градуированные, предложенные В. Н. Туголуковым или обычные градуированные пробирки; центрифуга.

Ход определения. Порцию желудочного сока пропускают через бумажный фильтр. Микропипеткой берут 0,1 мл фильтрата, переносят в обычную пробирку, куда предварительно было налито 9,9 мл дистиллированной воды (разведение 1 : 100), и тщательно перемешивают. Пипетку несколько раз ополаскивают содержимым пробирки.

В специальную градуированную центрифужную пробирку вносят 1 мл разведенного в 100 раз желудочного сока (опыт), а в другую градуированную пробирку — 1 мл прокипяченного разведенного сока (контроль). В каждую пробирку добавляют по 2 мл 2%-ного раствора сухой плазмы. Обе пробирки ставят в термостат при 37°С на 20 ч. После этого в каждую пробирку добавляют по 2 мл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Содержимое пробирок перемешивают стеклянной палочкой до получения однородной суспензии и центрифугируют 10 мин при 1500 об/мин. Измеряют величину осадка в пробирке.

По разнице в величине осадка в опытной и контрольной пробирках вычисляют содержание пепсина в 100 мл неразведенного желудочного сока. Далее устанавливают показатель переваривания субстрата по формуле:

$$M = (A - B)\ \frac{40}{A}$$

где M — показатель переваривания; A — величина осадка в контроле; B — величина осадка в опыте; 40 — постоянная величина, установленная экспериментальным путем.

Пересчет показателя переваривания проводят по таблице 30. Концентрацию пепсина выражают в мг/% фармакопейного препарата. Так как для исследования берут 1 мл разведенного в 100 раз желудочного сока, полученный результат умножают на 10 000.

30. Пересчет показателей переваривания белкового субстрата (раствор сухой плазмы) **на содержание пепсина в желудочном содержимом**

Показатель переваривания (M)	Содержание пепсина или уропепсиногена (мг %)	Показатель переваривания (M)	Содержание пепсина или уропепсиногена (мг %)	Показатель переваривания (M)	Содержание пепсина или уропепсиногена (мг %)
1	0,5	14	4,7	26	27
2	0,8	15	5,0	27	34
3	1,0	16	5,5	28	42
4	1,5	17	6,2	29	50
5	1,7	18	6,7	30	59
6	2,0	19	7,5	31	68
7	2,5	20	8	32	77
8	2,7	21,5	9	33	86
9	3,0	22,5	10	34	96
10	3,5	23	12	35	106
11	3,7	24	16	36	102
12	4,0	25	20	37	150
13	4,5				

Пример. Допустим, величина осадка в контроле оказалась 0,5 мл, а величина осадка в опыте 0,1 мл. В этом случае показатель переваривания белка (M) будет равен $(0,5 - 0,1)\ \frac{40}{0,5}$, или 32. Находим в таблице эту величину. Она составляет 77 мг стандартного пепсина.

Определение активности пепсина в желудочном содержимом с использованием в качестве субстрата гемоглобина (метод М. Л. Ансона в модификации М. П. Черникова). *Принцип.* Гемоглобин гидролизуется пепсином. Об активности

фермента судят по концентрации образовавшихся в процессе ферментативной реакции продуктов гидролиза, не осаждаемых трихлоруксусной кислотой.

Реактивы. 1. 0,1 моль/л глициновый буфер, pH 1,5. 7,505 г глицина и 6,85 г хлористого натрия растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды в мерной колбе на 1 л и доводят объем дистиллированной воды до метки. 33 мл этого раствора смешивают с 67 мл 0,1 н. раствора соляной кислоты, проверяют pH. Стабилен в течение месяца при хранении в холодильнике.

2. 0,1 н. (0,1 моль/л) раствор соляной кислоты.

3. 1%-ный раствор гемоглобина в 0,1 моль/л глициновом буфере. Хранят в холодильнике. Годен в течение недели.

4. 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты.

5. Кристаллический пепсин.

Калибровочные растворы пепсина. Основной раствор: 7,5 мг пепсина растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды в мерной колбе на 1 л и доводят дистиллированной водой до метки. Получается раствор, содержащий 7,5 мкг/мл пепсина. Рабочие растворы готовят разведением основного раствора дистиллированной водой в 2, 4, 8 раз и получают растворы с содержанием пепсина 3,75; 1,87 мл и 0,94 мкг/мл.

Оборудование. Спектрофотометр; секундомер; колбы мерные.

Ход определения. В опытные пробирки вносят по 1 мл раствора гемоглобина и 1 мл разведенного в 10 или 100 раз желудочного содержимого. Инкубируют 10 мин (точно по секундомеру) при 37°С. Затем добавляют 3 мл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 1 ч. Центрифугируют 10 мин при 1500 об/мин. Измеряют оптическую плотность надосадочной жидкости при длине волны 280 нм против дистиллированной воды.

Холостую пробу ставят, как опытную, но трихлоруксусную кислоту добавляют до инкубации.

Расчет ведут по калибровочному графику; активность пепсина выражают в мкг на 1 мл желудочного содержимого. При построении этого графика калибровочные пробы ставят, как и опытные, но вместо желудочного содержимого в пробирки добавляют по 1 мл соответствующего раствора пепсина. Из экстинкции калибровочных проб вычитают экстинкцию холостой пробы. На оси ординат откладывают получаемую разницу экстинкции, на оси абсцисс — содержание пепсина в мкг/мл.

Для вычисления активности пепсина в желудочном содержимом значения, найденные по калибровочному графику, умножают на разведение желудочного содержимого.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОПЕПСИНОГЕНА В МОЧЕ (ПО В. Н. ТУГОЛУКОВУ)

Принцип метода тот же, что и для определения активности пепсина в желудочном содержимом. Уропепсиноген определяют в суточном количестве мочи или в моче, полученной в утренние часы.

Ход определения. В градуированную центрифужную пробирку наливают 1 мл мочи (опыт), а в другую такую же пробирку — 1 мл предварительно прокипяченной мочи (контроль). В каждую пробирку добавляют по 2 мл 2%-ного раствора сухой плазмы. Обе пробирки ставят в термостат при 37°С на 20 ч. После этого в каждую пробирку наливают по 2 мл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Содержание пробирок перемешивают стеклянной палочкой до получения однородной суспензии и центрифугируют 10 мин при 1500 об/мин. Определяют величину осадка в опытной и контрольной пробирках. Установленные цифры записывают. Затем производят расчет показателя переваривания субстрата (M) по формуле:

$$M = (A - B) \cdot \frac{40}{A}.$$

Обозначения показателей формулы см. в предыдущем методе. По таблице 30

находят содержание уропепсиногена в мг%. Чтобы узнать, какое количество уропепсиногена содержится в суточном количестве мочи, получаемый результат умножают на количество мочи, собранной за сутки.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕПСИНОГЕНА В КРОВИ (ПО В. Н. ТУГОЛУКОВУ)

Принцип. В основе данного метода лежит способность пепсиногена в кислой среде расщеплять белки плазмы. По количеству расщепленных белков плазмы в стандартных условиях оценивается протеолитическая активность крови.

Реактивы. 1. Натрий лимоннокислый (натрий цитрат) или 1%-ный раствор гепарина.

2. 0,1 н. (0,1 моль/л) раствор соляной кислоты (готовят из фиксанала).

3. 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты.

Оборудование. Пробирки центрифужные и градуированные; центрифуга.

Ход определения. В обычную сухую центрифужную пробирку помещают несколько кристалликов щавелево- или лимоннокислого натрия или 2—3 капли гепарина и 2 мл крови, взятой натощак. Полученную после центрифугирования плазму отсасывают пипеткой, количественно переносят в химическую пробирку, где смешивают с равным объемом дистиллированной воды. Разведенную плазму в соотношении 1 : 1 разливают по 0,5 мл в две градуированные центрифужные пробирки. В одну из них добавляют 2 мл дистиллированной воды (контроль), в другую — 2 мл 0,1 н. раствора соляной кислоты (опыт). Обе пробирки ставят в термостат при 37°С на 20 ч. Затем в каждую пробирку добавляют по 2 мл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Содержимое пробирок тщательно перемешивают стеклянной палочкой и центрифугируют 10 мин при 1500 об/мин. Отмечают объемы осадка в контрольной и опытной пробирках.

Расчет проводят по той же формуле, что и при определении уропепсиногена. Установив показатель переваривания (*М*) по таблице 31, определяют концентрацию пепсиногена в плазме. По данному методу содержание пепсиногена в плазме здоровых поросят находится в пределах 2,6—8,6 мг%, в среднем 5,6 мг%. При язвенной болезни содержание его резко увеличено (А. В. Коробов и др., 1982).

31. Пересчет показателей протеолитической активности плазмы (величина *М*) на содержание пепсиногена

Показатели (величина *М*)	Содержание пепсиногена в плазме, мг %	Показатели (величина *М*)	Содержание пепсиногена в плазме, мг %
1	2,0	7	8,6
2	2,6	8	10,4
3	3,4	9	12,4
4	4,4	10	14,8
5	5,6	11	16,0
6	7,0	12	17,6

Клиническое значение. При ахилии желудка пепсин в желудочном содержимом, уропепсин в моче и пепсиноген в крови могут полностью отсутствовать, а при язвенной болезни желудка в стадии обострения количество этих показателей резко увеличивается. Обнаружение уропепсиногена у животных

имеет большое значение при оценке секреторной деятельности желудка. По снижению показателей уропепсиногена можно судить о степени функциональной недостаточности структурных элементов слизистой оболочки.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖЕЛЧИ И СКРЫТОЙ КРОВИ В СОДЕРЖИМОМ ЖЕЛУДКА

Присутствие желчи в желудочном содержимом можно определить визуально, в сомнительных случаях прибегают к химическим реакциям.

Проба Розина. В пробирку наливают 2—3 капли профильтрованного желудочного содержимого и столько же дистиллированной воды, хорошо смешивают и наслаивают осторожно 1—2 мл 1%-ного спиртового раствора йода. При наличии желчных пигментов на границе обеих жидкостей получается зеленое кольцо.

Проба Гмелина. В пробирку вносят 2—3 мл концентрированной азотной кислоты и осторожно наслаивают равное количество фильтрата желудочного сока. Желчные пигменты на границе соприкосновения жидкостей образуют зеленое кольцо окрашивания.

Скрытую кровь в желудочном содержимом определяют химическими способами: реакцией Вебера с гваяковой смолой, пробой с амидопирином и реакцией Адлера с бензидином.

Проба Вебера. К 5 мл нефильтрованного содержимого желудка прибавляют 3 капли ледяной уксусной кислоты, тщательно смешивают и оставляют на 5 мин. Затем добавляют 5 мл эфира и 2 капли спирта. Полученную смесь встряхивают и, дав постоять ей 10 мин, берут 2 мл эфирной вытяжки, куда прибавляют 6 капель свежеприготовленного спиртового насыщенного раствора гваяковой смолы и 5—8 капель 3%-ной перекиси водорода. В присутствии крови появляется синее окрашивание.

Проба с амидопирином. К 2—3 мл эфирной вытяжки приливают 5—8 капель 5%-ного раствора амидопирина в 90%-ном спирте и 8 капель свежей 3%-ной перекиси водорода. В присутствии крови смесь окрасится в фиолетовый цвет.

Реакция Адлера с бензидином. В пробирку наливают 3 мл нефильтрованного желудочного содержимого, 10 капель свежеприготовленного 1%-ного раствора бензидина в ледяной уксусной кислоте и 10 капель 3%-ной свежей перекиси водорода. В присутствии крови появляется зеленое окрашивание.

Клиническое значение. При ряде заболеваний в желудочном содержимом нередко обнаруживают молочную кислоту, летучие жирные кислоты, кровь, желчные пигменты. Так, при хронических гастритах с секреторной недостаточностью (гипохлоргидрия, ахлоргидрия) наряду с молочной кислотой образуются летучие жирные кислоты (уксусная, масляная), так как под влиянием микроорганизмов в желудке развиваются процессы брожения и появляются расстройства желудочно-кишечного тракта. Наличие крови (кровяных пигментов) в желудочном содержимом указывает на скрытое кровотечение и имеет большое диагностическое значение при остром геморрагическом гастрите, язвенно-эрозивном гастрите, язвенной болезни желудка. Желчные пигменты в желудок попадают из двенадцатиперстной кишки вследствие антиперистальтики и нарушения привратника.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖЕЛУДОЧНОГО ЛЕЙКОПЕДЕЗА

В ветеринарной клинике желудочный лейкопедез определяют только после разработки методики получения желудочного сока. Данный способ заключается в следующем. Набирают в пипетку 6 мл желудочного сока сразу же после получения стимулированной порции и переносят в центрифужную пробирку с двумя метками. На уровне одной из них объем пробирки равен 1 мл, на уровне второй — 6 мл. Содержимое пробирки центрифугируют 15 мин при 2000 об/мин. После центрифугирования отсасывают пипеткой с резиновым баллончиком верх-

ний слой содержимого пробирки с таким расчетом, чтобы осталось в ней ровно 1 мл осадка (до первой метки); последний тщательно взбалтывают (покачиванием пробирки о ладонь) и продувают струей воздуха через меланжер. Когда в пробирке образуется однородная масса, ею наполняют смеситель для лейкоцитов до метки 0,5, после чего насасывают в него до метки 11 1%-ный раствор поваренной соли и тщательно взбалтывают. Затем удаляют из меланжера 1—2 капли жидкости, а 3—4-й каплей заряжают камеру Горяева и подсчитывают лейкоциты под средним увеличением микроскопа в 100 больших квадратах, не разделенных на малые. Число лейкоцитов умножают на 50 (постоянный коэффициент) и получают количество лейкоцитов в 1 мкл осадка желудочного сока.

Клиническое значение. Увеличение числа лейкоцитов в желудочном содержимом свидетельствует о наличии воспалительных процессов в слизистой оболочке и стенке желудка.

По данным А. М. Смирнова, у здоровых лошадей среднее количество лейкоцитов в 1 мкл осадка желудочного сока составляет 250 (от 150 до 500). По В. А. Говырину, у здоровых собак желудочный лейкопедез в среднем 74 в 1 мкл (от 29 до 179). При острых гастритах, язвенной болезни желудка количество лейкоцитов увеличивается в 10—15 раз.

Источники: 49, 71, 115, 123, 126.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ НОВОРОЖДЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИММУННЫХ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПО РЕАКЦИИ ПОМУТНЕНИЯ С СУЛЬФАТОМ ЦИНКА (ЦИНК-СУЛЬФАТНЫЙ ТЕСТ — ЦСТ)

Принцип. При внесении в раствор, содержащий иммунные белки, сернокислого цинка происходят изменения в белковой молекуле и раствор мутнеет. Степень помутнения раствора прямо пропорциональна содержанию иммунных глобулинов и может быть измерена фотометрическими приборами.

Реактивы. 1. 20,8 мг%-ный раствор сульфата цинка (х.ч.). Готовят в день исследований на прокипяченной дистиллированной воде для удаления углекислого газа. Длительному хранению не подлежит.

2. Барий сульфатный — стандарт мутности. 3,5 мл 1,15%-ного раствора хлористого бария (х.ч.) на дистиллированной воде вносят в мерную колбу на 100 мл и доводят до метки 0,2%-ным раствором серной кислоты. Полученный раствор соответствует 20 ед. ЦСТ по степени мутности. Для приготовления стандарта 40 ед. мутности в мерную колбу на 100 мл вносят 6 мл 1,15%-ного раствора хлористого бария, а для 10 ед. — 1,5 мл, растворяя далее, как в предыдущем случае. По полученным трем стандартным растворам мутности 10, 20, 40 ед. строят калибровочную кривую для данного прибора (ФЭК).

Оборудование. Фотоэлектроколориметр; пробирки химические на 5, 10 мл; пипетки на 1,5 и 10 мл; мерные колбы на 100 мл.

Ход определения. Кровь берут с соблюдением соответствующих мер асепсиса из яремной вены стерильным шприцем через инъекционную иглу в количестве 2,5—3 мл. Затем до ее свертывания осторожно переливают в 5 мл пробирку и закрывают пробкой. Сыворотку получают известными способами, в ней не должно быть следов гемолиза.

В химически чистую пробирку емкостью 10 мл вносят 6 мл раствора сернокислого цинка, в контрольную пробирку — 6 мл дистиллированной воды. В обе пробирки добавляют по 0,1 мл исследуемой сыворотки и выдерживают при комнатной температуре 1 ч, в течение которого содержимое пробирок тщательно перемешивают 3 раза. Фотометрирование проводят в кюветах толщиной слоя 10 мм при длине волны 500 нм (красный светофильтр) против контроля (дистиллированная вода с добавлением сыворотки). По полученному значению экстинкции на калибровочной кривой находят значение ед. ЦСТ. При пересчете содержания иммунных белков в сыворотке крови в мг/мл можно воспользоваться таблицей 32.

Клиническое значение. Определение суммарного количества иммунных белков в сыворотке крови у новорожденных животных, у которых ос-

Пересчет содержания иммунных белков в сыворотке крови, мг/мл

[illegible]	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
10	8,53	9,60	10,67	11,74	12,81	13,88	14,95	16,02	17,09	19,23
20	20,30	21,37	22,44	23,51	24,58	25,65	26,72	27,79	28,86	29,93
30	31,00	32,07	33,14	34,21	35,28	36,35	37,42	38,49	39,56	40,63
40	41,70	42,77	43,83	44,91	45,98	47,05	48,12	49,19	50,26	51,32

новное накопление их в первые дни жизни идет, как правило, за счет абсорбции из молозива, имеет большое значение. У телят абсорбция колостральных белков происходит в течение первых 2 сут жизни, после чего эпителий кишечника становится непроницаемым для цельных молекул белка. У ягнят и козлят кишечный барьер закрывается еще раньше. Поэтому кровь у телят для исследований на содержание колостральных иммунных глобулинов берут в возрасте 48 ч.

При оценке уровня резистентности учитывают, что надежная иммунная защита новорожденных телят обеспечивается при концентрации колостральных иммунных глобулинов в крови теленка 1,4—1,45 г/кг массы тела, а это соответствует величине ЦСТ около 20—22 ед. или 19,23—21,37 мг/мл содержания белка в сыворотке крови. Концентрация иммунных белков ниже указанных значений характеризует недостаточный или низкий уровень резистентности, а при содержании их 20 ед. ЦСТ и более — удовлетворительный или высокий уровень. Повышенное содержание белков в сыворотке крови возможно при диарее, приводящей к обезвоживанию организма, что определяется по величине гематокрита. Снижение иммунных белков наблюдают у животных, поздно получавших молозиво или недостаточное его количество. Для насыщения крови колостральными белками теленок должен получить около 10—12 л молозива в первые дня жизни. Животные с пониженным содержанием иммунных белков в сыворотке крови (гипогаммаглобулинемия) склонны к различного рода заболеваниям.

Источники: 18, 138.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК КРОВИ ПО КОСТ И СТЕНКО

Принцип. При контакте с иммунологически чужеродными частицами специализированные клетки крови (моноциты, гранулоциты) поглощают (фагоцитируют) и разрушают их внутриклеточными ферментами. В приготовленных на стекле и окрашенных гематологическими красителями препаратах под микроскопом подсчитывают результаты фагоцитоза.

Реактивы. 1. 4%-ный нейтральный раствор натрия лимоннокислого, стерильный.

2. 0,85%-ный раствор натрия хлористого, стерильный.

3. Взвеси живых или убитых микробов (по стандарту в 1 мл взвеси, 1, 2 или 4 млрд. микробных тел).

Оборудование. Термостат; микроскоп биологический; агглютинационные (видалевские пробирки); химические пробирки; капилляр от аппарата Панченкова, пипетки на 1,5 мл.

Ход определения. В видалевскую пробирку вносят 1 капилляр Панченкова с 4%-ным раствором цитрата натрия, 2 капилляра крови, 1 капилляр жидкой однодневной культуры с 1—2 млрд/мл микробных тел или убитых микробов с концентрацией 4 млрд/мл. Кровь в пробирке тщательно перемешивают и ставят на 1 ч в термостат при 37°С. Затем содержимое пробирки перемешивают и на предметных стеклах готовят мазки; их подсушивают, фиксируют и красят обычными методами. В окрашенных мазках подсчитывают 100 нейтрофилов под иммерсионной системой микроскопа. Высчитывают процент фагоцитирующих клеток — показатель фагоцитарной активности. Определяют количество микробов, захваченных каждым фагоцитом, находят среднее значение для одного фагоцита — фагоцитарный индекс.

Для оценки переваривающей активности клеток фагоцитированных микробов при подсчете распределяют по интенсивности их окрашивания на три группы: интенсивно окрашенные (непереваренные), слабо окрашенные (частично переваренные) и почти полностью разрушенные (переваренные).

Источники: 2, 19.

МИКРОМЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК КРОВИ

В данном методе используется небольшое количество капиллярной крови, исключается потеря активно фагоцитирующих клеток в результате прилипания к поверхности стекла. Клетки крови сразу вступают в контакт с объектом фагоцитоза, что увеличивает достоверность и воспроизводимость результатов.

Реактивы. 1. Стабилизатор крови по прописи: трилон — Б (х.ч.) — 5, глюкоза — 1,5 г, вода дистиллированная — 100 мл или 4%-ный раствор лимоннокислого натрия. Взвесь суточной культуры (2 млрд/мл) E. coli (например, штамм [illegible]) в забуференном двузамещенным фосфорнокислым натрием физрастворе до pH 7,41.

2. 1%-ный раствор силиконового масла в хлороформе.

Оборудование. Меланжеры-смесители для подсчета лейкоцитов (перед использованием их силиконируют); игла Франко или ланцеты для взятия капиллярной крови; термостат; микроскоп биологический.

Ход исследования. В меланжер-смеситель набирают суточную культуру микробов до метки I, все это просасывают в расширение и берут такой же объем стабилизатора крови. Затем готовят место для взятия капиллярной крови. Вытекающую кровь набирают в тот же меланжер до метки II, кончик его вытирают. На меланжер надевают герметизирующее резиновое кольцо, тщательно перемешивают и помещают в термостат при 37°С. Первый мазок делают на предметном стекле через 30 мин инкубации, предварительно удалив из капилляра часть крови, не участвовавшей в реакции. Готовят не менее трех мазков, которые фиксируют и красят азур-эозином. Следующие серии по три мазка приготавливают через 1 и 2 ч инкубации.

В мазках под иммерсионной системой микроскопа считают все клетки белой крови (лейкоциты) до тех пор, пока не будет найдено 100 фагоцитов (нейтрофилы и моноциты). В каждой фагоцитирующей клетке учитывают число поглощенных микробов и состояние деградации микробной клетки, которая оценивается субъективно по характеру окраски, величине и степени набухания микробов. Различают три степени деградации клетки: 1) микробная клетка четко контурирована, размеры не увеличены, окраска базофильная — клетка не подвергнута перевариванию; 2) клетка слегка или сильно увеличена, набухшая, но контуры тела сохранены, окраска нейтральная или оксифильная, имеются отдельные просветления — микроб подвергся действию ферментов фагоцитов; 3) клетка сильно набухшая, почти полностью переваренная, без очертаний, имеет вид детрита.

Результаты исследований регистрируют. Из 100 записанных подряд клеток находится их процентное соотношение, то есть лейкограмма. По найденным 100 фагоцитам определяют число клеток, участвующих в фагоцитозе (захвативших определенное количество микробов), или процент фагоцитоза. Общее число захваченных микробов, поделенное на количество фагоцитирующих клеток, есть фагоцитарный индекс — среднее количество микробов, захваченное одним фагоцитом.

При высокой функциональной активности фагоцитов процесс переваривания захваченных микробов начинается немедленно, и уже в первые 30 мин отмечают не только визуальное изменение микробной клетки, но и преобразование некоторых нейтрофильных лейкоцитов (набухание, изменения очертания ядра, слабое прокрашивание и т. д.), то есть появляются признаки, характеризующие [illegible] (самораспад) и начало деструкции нейтрофила. В течение 2 ч фагоцитарная реакция в норме заканчивается перевариванием захваченных микробов и разрушением полиморфноядерных фагоцитов.

Для количественной оценки переваривающей способности фагоцитов введено понятие индекса завершенности фагоцитоза. Для этого определяют отношение процента фагоцитоза, полученного через 30 мин инкубации, к проценту фагоцитоза, полученному через 2 ч, и отношения фагоцитарных индексов. Среднее число из этих показателей служит индексом завершенного фагоцитоза (ИЗФ). Принято считать, что ИЗФ больше 1 — завершенный, меньше 1 — незавершенный.

У новорожденных животных при значительном различии содержания цитов целесообразно оценивать фагоцитарную активность клеток крови элиминирующей ее способности (ЭСК).

Под ЭСК понимается способность клеток, содержащихся в 1 мкл фагоцитировать некоторое количество антигенно чужеродных частиц в 30 мин и выражается количеством поглощенных за этот срок частиц (микр и др.).

Определение основных показателей фагоцитоза клеток периферической обычно проводят параллельно с определением количества лейкоцитов и граммой крови.

Пример расчета процента фагоцитоза (фагоцитарный показатель по Г геру). Допустим, что в крови общее количество лейкоцитов в 1 мкл лейкограмма (%): базофилы — 1; эозинофилы — 6,5; нейтрофилы юные палочкоядерные — 3; сегментоядерные — 28; лимфоциты — 57,5; моноциты При учете реакции фагоцитоза из 100 фагоцитов микробы обнаружены в 8 ках; следовательно, процент фагоцитоза равен 85.

Пример расчета фагоцитарного числа (фагоцитарный индекс по Р Внутри 85 фагоцитов обнаружен 561 микроб; следовательно, фагоцитарн сло равно: 561 : 85=6,6.

Пример расчета ИЗФ. Найдено, что процент фагоцитоза через 30 мин через 1 ч — 72, через 2 ч — 68. Фагоцитарное число (ФЧ) через 30 мин через 1 ч — 5,8, через 2 ч — 3,1.

ИЗФ через 1 ч=85 : 72+6,6 : 5,8 : 2=1,58.

ИЗФ через 2 ч=85 : 68+6,6 : 3,1 : 2=1,689.

Пример расчета элиминирующей способности крови (ЭСК). В лейкогр исследуемой крови найдено, что способные к фагоцитозу клетки состав 35% лейкоцитов, то есть в 1 мкл их содержится 2800 (8000 : 100·35). Из фагоцитировало 85%, или 2380 клеток (2800 : 100·85).

ЭСК=6,6·2380=15 708 микробов за 30 мин.

Пример расчета индекса завершенности. Показатель характеризует ст завершенности фагоцитоза в момент исследования и определяется отнош числа микробов, находящихся во второй и третьей стадии разрушения, к щему числу захваченных фагоцитами микробов. Например, через 30 мин и бации клеток крови с объектом фагоцитоза оказалось поглощено 561 ми из них находятся во второй и третьей степени деградации 320 микробов; довательно, индекс завершенности фагоцитоза через 30 мин=320 : 561=0,

Клиническое значение показателей фагоцитоза. Полиморфно ные лейкоциты, бо́льшую часть которых составляют нейтрофилы, в перифер ской крови осуществляют защиту организма в процессе фагоцитоза, в В-кл ном иммунитете, а также при воспалении и тканевых повреждениях.

Функции нейтрофилов по охране организма от чужеродных антигенных действий включают хемотаксис, фагоцитоз, уничтожение микробов и перева ние поглощенных веществ. Хемотаксис происходит под воздействием хи ских веществ, специфически активирующих движение фагоцитов против гр ента концентрации этих веществ. Хемотаксическим эффектом обладают ми вещества, в том числе некоторые бактериальные продукты, компоненты ли цитов, разрушенные ткани, фактор проницаемости лимфоузлов и компо комплемента.

За хемотаксисом нейтрофилы фагоцитируют бактерии или другие чуж ные частицы.

Метаболические процессы в период фагоцитоза сопровождаются повы ным потреблением кислорода, усилением синтеза перекиси водорода, пов нием гликолиза, активацией кислых ферментов, понижением pH, повыш активности гексозомонофосфатного шунта.

В уничтожении микробов принимают участие различные компоненты гр из них выделены миелопероксидаза, лизоцим, лейкин, фагоцитин и др. катионные белки, обладающие антибактериальной специфичностью.

Дегрануляция и уничтожение бактерий происходят под действием гидро ческих ферментов гранул, выделяющихся в фагоцитарную вакуоль.

Из вышеизложенного вытекает, что фагоцитоз является сложнейшей ф цией специализированных клеток, направленной на сохранение иммунологи

модульности организма, то есть функцией защиты организма в первую очередь от чужеродных корпускулярных частиц. Однако многие механизмы фагоцитоза до сего времени изучены недостаточно, особенно в процессе онтогенеза сельскохозяйственных животных. Расхождения в результатах, по-видимому, связаны с различными приемами исследований фагоцитоза у новорожденных телят и плодов, клетки крови которых более чувствительны (по сравнению с взрослыми животными) к внешним (физическим) и внутренним (биохимизм крови) воздействиям. На фагоцитарную активность крови новорожденных телят влияет организм матери. При одновременных исследованиях элиминирующей способности крови матери и новорожденного установлена связь между этими показателями, выражаемая регрессией типа: $У = -1{,}88 + 1{,}19 - 0{,}008\ X^2$, где $У$ — телёнка; X — ЭСК матери.

У новорожденных животных уровень фагоцитарной защиты довольно высок, в некоторых случаях превышает даже таковой матери. Полноценность клеточной реакции во многом определяется полноценностью внутриутробного развития плода. Недостаточное или неполноценное питание, хронические секундарные интоксикации микотоксинами, нитритами и нитратами значительно понижают способность фагоцитарной защиты новорожденного, снижают его устойчивость к бактериальным инфекциям.

В результате генетических дефектов или вследствие воздействий извне может наблюдаться нарушения и дефекты в фазах прикрепления, поглощения и переваривания микроорганизмов. Механизмы этих нарушений еще недостаточно изучены. Нарушения фаз прикрепления и поглощения могут быть связаны с недостаточностью JgG, генетическим или приобретенным дефицитом C_3 или тромбоцитарного сократительного белка, принимающего участие в фазе поглощения. Специфичность иммунных белков, имеющих свойства антител, по-видимому, определяет избирательность фагоцитоза у одного и того же организма к разным видам или штаммам микробов.

Нарушения способности уничтожать микроорганизмы гранулоцитами зависят от изменения их клеточного метаболизма, неспособности образовывать перекись, что связано с низким уровнем НАДФ-оксидаз. Элиминирующая способность крови нарушается при изменении образования и разрушения гранулоцитов, что может быть вызвано лекарственными или кормовыми токсикозами, особенно секундарными микотоксикозами, тяжелыми инфекциями, аутоинтоксикацией, дефицитом некоторых витаминов, нарушениями кормления и др.

Повышенная скорость разрушения гранулоцитов может обуславливаться определенными иммунологическими нарушениями, связанными с образованием комплексов белок — лекарство (или химическое вещество), обладающих свойствами антигена и разрушающихся в лимфоидных органах.

Источники: 42, 119.

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ Т- И В-ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ

Общие положения. Т-(тимусзависимые) и В-(бурсазависимые) лимфоциты имеют определенные морфофункциональные различия, по которым разработан ряд методов, позволяющих выделить и идентифицировать эти клетки.

Наиболее широко применяют методы выделения лимфоцитов из периферической крови и органов, основанные на принципе различной скорости седиментации их в градиентах плотности. Последние изготавливают из различных веществ с высокой молекулярной массой — таких как сахароза, гуммиарабик, сывороточный альбумин (БСА), синтетические соединения (фикол, перкол, верографин, урографин, метризоат и др.), а также их смесей, комбинируя которые получают растворы с плотностью 1,050—1,090 (в этих пределах можно разделить практически клетки всех тканей).

Однако для выделения клеток крови новорожденных животных (телят, поросят) пригодны далеко не все рекомендуемые градиенты плотности. Эта особенность связана с повышенной чувствительностью клеточных мембран новорожденных к изменению осмотического давления, ионного состава и pH среды.

Поэтому при изготовлении градиентов плотности для разделения клеток рожденных необходимо контролировать не только плотность раствора (1,[illegible] 1,071), но также осмоляльность — 295—305 миллиосмолей (мосмоль) и [illegible] (7,38—7,41).

Осмотическое давление растворов измеряют специальным прибором — [illegible] метром или рассчитывают приближенно по формуле: $P = \frac{C}{M}$,

где P — осмотическое давление в миллиосмолях; C — концентрация вещества в мг/л; M — молекулярная масса вещества. Как видно из формулы, наибольшее влияние на величину осмотического давления оказывают вещества с малой молекулярной массой, легко диссоциирующие соли минеральных кислот — соляной, серной и т. д. Оптимальными условиями сохранения жизнеспособности клеток при их выделении, отмывании и других процедурах являются наличие ионов Na, Ca, Mg, Cl и др. в соотношениях, близких к плазме крови, а также присутствие белков. С этой целью при изготовлении градиентов плотности отмывающих и разбавляющих сред используют сложные солевые составы, содержащие небольшие количества либо аутологичных сывороточных белков, либо инактивированную эмбриональную сыворотку плодов крупного рогатого скота [illegible] (эмбриональная телячья сыворотка).

Жизнеспособность лимфоцитов крови обеспечивается постоянно протекающими процессами обмена в клетках и сопровождается определенными энергетическими затратами, которые в основном обеспечиваются гликолизом. При дефиците глюкозы в растворах или при длительном (в течение нескольких [illegible]) пребывании клеток крови в среде с температурой выше 4°С процессы гликолиза могут нарушаться за счет исчерпывания ресурсов и приводить к гибели клеток.

Для обратимого ингибирования гликолиза в некоторых случаях применяют азид натрия (NaN_3, х.ч.), например при передержке клеток в среде без глюкозы для стабилизации розеток, легко распадающихся вследствие высокой скорости обменных процессов в мембранах. Действие азида натрия в конечной концентрации (0,05%-ная) обратимо, функция Т- и В-лимфоцитов полностью восстанавливаются после трехкратного отмывания. При внесении в градиент большого количества клеток возможно их слипание при центрифугировании, особенно если его проводят в одном режиме, а не дифференциально. Клетки крови [illegible] склонны к самоагрегации, чему способствует несоответствие pH и изотоничности растворов. Контроль оптимальности условий выделения лимфоцитов осуществляют путем учета количества выделенных лимфоцитов в сравнении с фактическим содержанием их в 1 мл крови (то есть процент выделения), процента жизнеспособности (определяется по поглощению коллоидных красителей погибшими клетками), чистоты популяции лимфоцитов (то есть процент примеси клеток других групп — нейтрофилов, эритроцитов и др.).

Лимфоциты сохраняют функциональную способность к иммунным реакциям в течение первых 4—6 ч после взятия крови; это время зависит от характера взятия (стерильное, загрязнено микроорганизмами), стабилизатора крови (например, гепарин вызывает ускоренное «старение» клеток), условий хранения, состояния организма донора и др. Поэтому исследования иммунокомпетентности клеток крови, основанные на тестах розеткообразования лимфоцитов с эритроцитами или корпускулярными нагруженными индикаторами (зимозан, латекс и др.), нужно проводить в течение первых часов после взятия крови, так как к реакциям данного типа способны только живые клетки. Срок хранения крови увеличивается при стерильном ее взятии, добавлении в стабилизатор ингибиторов метаболизма (при этом процесс ингибирования должен быть обратимым) при содержании ее в температурных условиях, близких к 0°С.

Идентификация Т- и В-лимфоцитов по их функциональным особенностям часто основана на способности Т-лимфоцитов образовывать розетки с гетерологичными эритроцитами, например эритроцитами барана (так называемые [illegible] зетки). Поверхностные мембранные рецепторы В-лимфоцитов имеют иммунное сродство к комплементу и образуют иммунную связь с C_3-компонентами комплексов ЕАС. Комплекс антитело — комплемент (АС) может быть связан с поверх

[illegible] рецепторами эритроцитов (ЕАС-комплекс) или комплемент сорбиру- [illegible] поверхности корпускулярной частицы, например зимозана ($ЗС_3$-комп- [illegible] Для установления иммунных связей между рецепторами лимфоцитов и [illegible] эритроцитов или иммунных комплектов необходимы определен- [illegible]ния. Процесс образования связей включает сближение лимфоцитов с [illegible]торами (эритроциты, частицы зимозана и др.), контакт, установление [illegible] консолидацию (уплотнение), а при учете реакции в фиксированных [illegible]ратах на предметных стеклах необходима фиксация связи за счет попе- [illegible]шивок в молекулах белка.

[illegible]ближение лимфоцитов с индикаторами достигается внесением достаточного [illegible]ства корпускулярных частиц индикатора (30—40 эритроцитов на 1 лим- [illegible]) мягким центрифугированием (250—300 g)* с целью осаждения всех [illegible] и лимфоцитов. Образование иммунных связей происходит наиболее ин- [illegible] при температуре, близкой к температуре тела исследуемого животно- [illegible]го пробы инкубируют около 30 мин при 37°С. Образование Е-розеток [illegible]фоцитами непрочное и подвержено самораспаду из-за высокой метаболиче- [illegible]ивности поверхностных мембран. Для сохранения их используют либо [illegible]натрия (0,05%-ной конечной концентрации), либо охлаждение проб. Ох- [illegible]ние около 0°С способствует консолидации связей, а для их фиксации [illegible]ют раствор глутарового альдегида в конечной концентрации не выше [illegible] (более высокие концентрации его способны к сшивкам неспецифических [illegible])

[illegible]ции, характеристика и приготовление наиболее часто применяемых рас- [illegible] при выделении и идентификации иммунокомпетентных клеток.

[illegible] Ficoll — Paque — импортный препарат (Швеция). Препарат продается [illegible]ованным по флаконам (100 мл) в готовом виде.

[illegible] Percoll — полимер на основе кремния, импортный препарат. Предназначен [illegible]риготовления градиентов плотности, применяемых при центрифугировании. [illegible]ный препарат поставляют в пластиковых флаконах (1000 мл) с плот- [illegible] 1,131. Готовят требуемые градиенты на физрастворе, так как сам пре- [illegible] не сбалансирован по изотоничности. При использовании несбалансиро- [illegible] растворов (или дистиллированной воды) происходит гемолиз эритро- [illegible] Плотность контролируют ареометром или же для приготовления градиен- [illegible]пользуют специальные устройства.

[illegible] Ficoll 400 — синтетический полисахарид. Белый порошок с молекуляр- [illegible]ассой 400 000. Применяют для приготовления градиентов плотности в со- [illegible] с другими солевыми растворами, часто с рентгеноконтрастными веще- [illegible] — урографином, верографином.

[illegible]риготовление раствора фикол-верографина с плотностью 1,071 для выде- [illegible] лимфоцитов: 9,5 г фикола 400 растворяют в 100 мл подогретого до 60— [illegible]забуференного фосфатами до pH 7,41 физиологического раствора хлорида [illegible] (ЗФР) (приготовление см. ниже) и добавляют 20 мл 60%-ного раство- [illegible]рографина (Verografin). Плотность корректируют добавлением либо не- [illegible]их капель верографина (для повышения ее), либо забуференного физ- [illegible]ра (для понижения) под контролем ареометра. Для приготовления рас- [illegible] впрок их нужно стерилизовать (например, пропускать через стерилизую- [illegible]фильтры) и хранить стерильно закрытыми при температуре не выше 8°С. [illegible]абуференный фосфатами физиологический раствор хлорида натрия (ЗФР) [illegible] 41 готовят следующим образом: 11,9 г двузамещенного кислого фосфорно- [illegible]го натрия ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, х.ч.) растворяют в 1 л 0,15 моль/л раствора [illegible]ида натрия (NaCl, х.ч.). 9,1 г однозамещенного фосфорнокислого калия [illegible]PO_4, х.ч.) растворяют в 1 л. 0,15 моль/л раствора хлорида натрия. Для [illegible]ения раствора, требуемого pH 82,5 мл раствора Na_2HPO_4 доводят до [illegible] раствором KH_2PO_4 под контролем pH-метра.

[illegible] Символом g обозначается величина ускорения. В иммунологических мето- [illegible]ванных с выделением живых клеток, режимы центрифугирования харак- [illegible]ют не числом оборотов ротора, а величиной $g.g = 1{,}1n^2R \cdot 10^{-5}$, где [illegible]корость вращения ротора, об/мин; R — радиус ротора от центра оси до [illegible]седиментации; 1,1; 10^{-5} — коэффициенты пересчета.

4. Раствор Хенкса применяют для отмывания клеток, ресуспендиро[illegible] их и т. д. В 1 л дистиллированной воды растворяют 8 г хлорида натрия, 0,4 [illegible] хлорида калия (KCl, х.ч.), 0,047 г двузамещенного фосфорнокислого на[illegible] ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$), 0,35 г бикарбоната натрия ($NaHCO_3$, х.ч.), 0,6 г однозам[illegible]ного фосфорнокислого калия (KH_2PO_4), 1 г глюкозы, 0,017 г фенилового [illegible]ного. pH доводят до 7,2 с помощью концентрированного раствора едкого н[illegible] (NaOH).

5. Раствор Олсвера применяют для отмывания, ресуспендирования н[illegible]ния эритроцитов и др. В 100 мл дистиллированной воды растворяют 2,0 [illegible] декстрозы, 0,8 г натрия лимоннокислого, 0,42 натрия хлорида. Раствор доп[illegible] до pH 6,1 10%-ным раствором лимонной кислоты (х.ч.) под контролем pH-метра.

6. Суспензией эритроцитов барана (ЭБ) выявляют поверхностные мемб[illegible]ные рецепторы Т-лимфоцитов в тесте прямого или спонтанного розеткообр[illegible]вания.

Приготовление рабочей суспензии ЭБ. Стерильно взятую в шприц кр[illegible] барана со стабилизатором (состав его см. стр. 213) разливают в центрифуж[illegible] пробирки. Центрифугируют при 1000—1200 g 15 мин и трижды отмывают ЗФР. После третьего отмывания из осадка ЭБ (который принимают за 100%-ную [illegible]центрацию) готовят 0,5%-ную взвесь ЭБ в растворе Олсвера. При добав[illegible] антибиотиков (пенициллин+стрептомицин) ЭБ сохраняются 2—3 нед. Для [illegible]становки реакции розеткообразования лучше брать ЭБ, приготовленные за [illegible] 2 сут. Перед использованием ЭБ вновь отмывают ЗФР при 1000 g дважды, [illegible]ле чего готовят рабочее разведение.

7. Суспензия зимозана (З). Применяют для выявления C_3-рецепторов на [illegible]верхности В-лимфоцитов в качестве носителя комплемента. Выпускают в [illegible] ампулированной стерильной суспензии (хранят при 4—20°С) или во флаконах [illegible] 4 г в виде сухого порошка (срок хранения при 4—10°С 2 года).

Список часто употребляемых сокращений. В-лимфоциты — бурсазависим[illegible] лимфоциты.

Т-лимфоциты — тимусзависимые лимфоциты.

С — комплемент.

C_3 — третий компонент комплемента.

З — зимозан.

$ЗC_3$-комплекс — зимозан, на поверхности которого сорбирован третий к[illegible]понент комплемента.

ЭБ — эритроциты барана.

ЭТС — эмбриональная телячья сыворотка.

ЗФР — забуференный фосфатами физиологический раствор хлорида натр[illegible]

РОК — розеткообразующие клетки, имеющие на поверхностной мембране р[illegible]цепторы, комплементарные поверхностным антигенным рецепторам гетеролог[illegible]ных эритроцитов, либо третьему компоненту комплемента (C_3), либо Fc-фр[illegible]менту иммунных белков.

Е-РОК — клетки, образующие розетки с гетерологичными эритроцитами.

ЕАС-комплекс — комплекс «комплемент+антиген», сорбированный на [illegible]верхности эритроцита.

ЕАС-РОК — клетки, образующие розетки с эритроцитами, нагруженн[illegible] «антиген+комплемент» комплексом.

Источники: 17, 40, 41, 81, 96, 93.

Выделение лимфоцитов из крови на градиентах плотности методом центр[illegible]фугирования. *Принцип.* При центрифугировании разбавленной крови па [illegible]диенте плотности клетки крови из-за их различной плотности под действи[illegible] центробежного ускорения движутся с различной скоростью, при этом проис[illegible]дит их разделение: эритроциты оседают на дно пробирки, гранулоциты на[illegible]дятся над эритроцитами, а лимфоциты, как менее плотные клетки, остаются [illegible] границе раздела; разбавленная кровь — жидкость с большой плотностью ([illegible] колл-верографин, перколл и др.).

Реактивы. 1. Раствор фикол-верографина с плотностью 1,071 при 4°С, p[illegible] 7,38—7,41, осмоляльность 295—305 мосм.

2. ЗФР pH 7,41.

) Эмбриональная телячья сыворотка) Добавляется в ЗФР в количестве 2% отмывании клеток.
) 0,5%-ный раствор трипанового синего ЗФР.
) Азид натрия (NaN_3, х. ч.).

Оборудование. Центрифуга с охлажденим микроскоп световой биологический; камеГоряева; пробирки стеклянные 100×10 мм; ины на 2, 5, 10 мл; иглы инъекционные 1 мм (№ 10100); пипетки пастеровские; метр для определения плотности раство от 1,060 до 1,120 (ГОСТ 1300—57 № 5).

Ход выделения. 1 мл крови, стерильно той в стабилизатор (см. стр. 213), разбав ЗФР 1 : 1 и 2 мл из шприца через тонглу наносят на поверхность фикол-верографина, налитого в пробирки 100×10 мм ота столбика градиента должна быть не нее 50 мм), выдерживают 15—20 мин при натной температуре, а затем центрифуги при 4°С дифференциально по схеме: мин — 450—500 g, 10 мин — 800—900 g, мин — 950—1000 g.

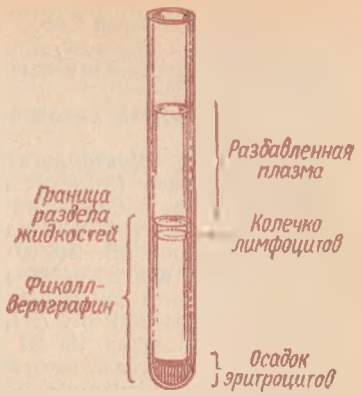


Рис. 12. Разделение клеток крови при центрифугировании на градиенте фикол-верографина.

После центрифугирования в пробирке происходит разделение клеток 12). Эритроциты оседают на дно, в средних и нижних слоях фикол-веро фина находятся гранулоциты, а па границе их и разбавленной плазмы в виде атого колечка находятся лимфоциты. Тонкой инъекционной иглой с зато ым концом 1 мл шприцем с подпружиненным поршнем осторожно отсасы лимфоциты с некоторым количеством фикол-верографина и переносят в ую пробирку. Ресуспендируют в ЗФР с добавлением 2% ЭТС (несколько раз бирают в шприц и выпускают суспензию клеток) и трижды отмывают, каж раз центрифугируя при 900—1000 g — 10—15 мин, удаляя супернатант и орожно ресуспендируя клетки в свежих порциях ЗФР+ЭТС. После третьего ивания клетки ресуспендируют в 0,5 мл ЗФР+ЭТС; проводят определение концентрации, жизнеспособности и чистоты выделенных лимфоцитов.

Концентрацию клеток при массовых исследованиях можно определять на оскопе (см. стр. 55) или камерным методом — в счетной камере Горяе (см. стр. 59). Жизнеспособность клеток устанавливают путем под а процента окрашенных клеток после добавления к капле взвеси клеток, на ной тонко оттянутой пастеровской пипеткой на предметное стекло, и капли 0,5%-ного раствора трипанового голубого. Капли перемешивают, покры покровным стеклом и просматривают под микроскопом через 5—7 мин. цент примеси к лимфоцитам определяют на фиксированном и окрашенном ными методами тонком мазке взвеси клеток. Для дальнейших работ по тификации Т- и В-лимфоцитов готовят рабочую взвесь лимфоцитов с кон трацией клеток $3—4 \cdot 10^6$ в 1 мл, либо разбавляя суспензию ЗФР, либо центрируя ее центрифугированием. Процент жизнеспособных клеток должен не менее 98, чистота выделенных фракций лимфоцитов — не менее 95%.

Идентификация Т-лимфоцитов методом образования розеток с эритроцитами рана (Е-РОК).

Принцип. Т-лимфоциты имеют рецепторы на поверхности мембраны, способ образовывать иммунную связь с поверхностными антигенами гетерологич эритроцитов (например, ЭБ). При этом эритроциты, располагаясь по окруж ти лимфоцита, образуют фигуру наподобие розетки (цв. табл. VII—VIII).

Реактивы. 1. 0,5%-ная суспензия ЭБ.
2. ЗФР (pH 7,41).
3. Раствор Олсвера (pH 6,1).
4. Метанол (яд!).
5. 0,6%-ный раствор глутарового альдегида.
6. Краситель «Азур II».

7. Краситель «Эозин БА».
8. Краситель «Прочный зеленый» (Fast. Green, FCF, «Sigma»).
9. Краситель «Светлый зеленый» (Light Green, SF, «Serva»).
10. ЭТС.
11. Рабочая взвесь лимфоцитов 3—4 млн. клеток/мл в ЗФР с добав[illegible] 2,5% ЭТС.

Оборудование. Центрифуга с охлаждением; термостат; холодильник [illegible] микроскоп световой (МБР-3); пипетки на 1, 5, 10 мл; пипетки пастер[illegible] предметные стекла обезжиренные.

Ход определения. К 0,25 мл рабочей взвеси лимфоцитов добавляют 0,[illegible] 0,5%-ной суспензии ЭБ. Выдерживают при комнатной температуре 20—2[illegible] центрифугируют при 300—400 g 5 мин, инкубируют при 4°С 15—18 ч.

Образовавшиеся иммунные связи фиксируют 0,6%-ным раствором глу[illegible] вого альдегида на ЗФР pH 7,41, добавляя 0,3 мл по каплям и осторожно р[illegible] пендируя клетки через 15—20 мин инкубации. Суспензию трижды отм[illegible] дистиллированной водой, центрифугируют по 5 мин при 250—300 g, каждый [illegible] ресуспендируют, набирая взвесь клеток через тонкую иглу 1 мл шприцем с [illegible] пружиненным поршнем. На предметное стекло наносят каплю взвеси кле[illegible] трех местах, при этом каждая капля должна занимать площадь около 1 [illegible] диаметре. Стекло кладут горизонтально и высушивают феном. Затем пре[illegible] фиксируют метиловым спиртом и окрашивают обычными гематологич[illegible] красками; используют также ускоренный метод, применяя раздельно осн[illegible] и кислый красители — при этом значительно сокращается время окраски [illegible] 1—1,5 мин) и уменьшается потеря клеток при длительных проводках в во[illegible] растворах красок.

1. Двухкомпонентная окраска с цветовой дифференциацией типов к[illegible] эритроциты — розово-красные, лимфоциты — темно-синие, до фиолетового [illegible] ядро и голубая цитоплазма. Красители: а) 1%-ный раствор «Эозина БА» в [illegible] ном этиловом спирте с добавлением 0,5% глицерина (х.ч.). Краску нан[illegible] на фиксированный препарат на 10—15 с, после чего смывают дистиллирован[illegible] водой; б) 0,3%-ный водный раствор «Азур II» pH 7 наносят на преп[illegible] после красителя «а» на 30—40 с и смывают дистиллированной водой.

2. Двухкомпонентная окраска с цветовой дифференциацией типов кле[illegible] эритроциты — изумрудно-зеленые, лимфоциты, цитоплазма и ядерные катио[illegible] белки — светло-зеленые и изумрудные, ядерные хроматиновые структуры — [illegible] но-синие. Красители: а) забуференный до pH 8,6 1%-ный водный раствор красит[illegible] «Прочного зеленого»; б) 0,3%-ный водный раствор «Азур II» pH 7. Красит[illegible] «а» наносят на фиксированный препарат на 1—1,5 мин, смывают забуферен[illegible] до pH 8,6 физиологическим раствором хлористого натрия, после чего докра[illegible] вают 30 с «Азуром II» и смывают нейтральной дистиллированной водой. Вм[illegible] красителя «Прочного зеленого» используют 1%-ный раствор «Светлого зелено[illegible]

Учет розеткообразующих клеток проводят под иммерсией микроско[illegible] Учитывают все клетки, присоединившие три эритроцита и более.

Определяют их процент к общему числу лимфоцитов и содержание абсо[illegible] ного числа в 1 мкл крови.

Идентификация В-лимфоцитов по выявлению рецепторов к третьему ком[illegible] ненту комплемента. *Принцип.* Установлено, что на В-лимфоцитах имеется ре[illegible] тор для третьего компонента комплемента. Определение комплемент-рецеп[illegible] является одним из тестов при определении В-лимфоцитов, для чего соедин[illegible] лимфоциты с эритроцитами барана, нагруженными комплементом (ЕАС [illegible] плекс).

Реактивы: 1. Раствор Хенкса.
2. ЗФР pH 7,41+2% ЭТС.
3. Сухая гемолитическая сыворотка против ЭБ (гемолизин).

Ход определения. ЭБ трижды отмывают раствором Хенкса и готовят [illegible] ную взвесь в этом растворе. Сухую гемолитическую сыворотку разводят р[illegible] твором Хенкса до титра 1 : 500. Смешивают в объемах (1 : 1) 5%-ную взвес[illegible] и гемолитическую сыворотку. Инкубируют при 37°С 30 мин и отмывают р[illegible] твором Хенкса, центрифугируя при 800 g 5 мин. Отмытые ЭБ инкубиру[illegible] равным объемом комплемента (в качестве источника которого можно испо[illegible]

[illegible] сыворотку мыши в титре 1 : 15) при 37°С 30 мин. После инкубации ЭБ [illegible] отмывают при том же режиме.

Смешивают рабочую взвесь лимфоцитов с отмытыми эритроцитами барана ([illegible] комплекс) в соотношении 1 : 50. При слабом перемешивании инкубируют [illegible] мин при 37°С. Подсчет розеток проводят в камере Горяева или готовят препараты на стекле, как при определении Т-лимфоцитов.

Контроль: для выявления спонтанных агглютинатов эритроцитов, похожих [illegible] розетки, эритроциты параллельно инкубируют без добавления лимфоцитов.

Идентификация Т- и В-лимфоцитов в одном препарате (методом Е-РОК и [illegible]-РОК). *Принцип.* Лимфоциты, способные к образованию Е-розеток (Т-лимфоциты) и C_3-связей (В-лимфоциты), могут быть выявлены в одном препарате при смешивании лимфоцитов, ЭБ и комплекса зимозан — третий фрагмент комплемента ($ЗС_3$-комплекс).

Реактивы. 1. Зимозан.

2. ЗФР pH 7,41.

3. ЭТС.

4. ЭБ.

5. Комплемент (сухая сыворотка) или свежая сыворотка мыши (титр 1 : 15).

6. Среда Игла (фабричная).

Ход определения. Подготовка $ЗС_3$-комплекса. 5 мл 0,1%-ной взвеси зимозана в дистиллированной воде прогревают на водяной бане при 80°С 30 мин, центрифугируют при 1000 g 10 мин, отмывают ЗФР и ресуспендируют в 5 мл ЗФР. Ампулу комплемента растворяют в 5 мл ЗФР, смешивают с 5 мл суспензии зимозана, инкубируют при 37°С 30 мин. Дважды отмывают ЗФР, ресуспендируют в 3 мл ЗФР или среды Игла. Получается 0,17%-ная взвесь зимозана, обработанного комплементом ($ЗС_3$-комплекс).

Равные объемы рабочей взвеси лимфоцитов, $ЗС_3$ и 0,5%-ной взвеси ЭБ смешивают в пробирке, выдерживают при 20—22°С 25 мин, после чего центрифугируют при 250—300 g 5 мин и инкубируют при 4°С 15—18 ч. Фиксируют глутаровым альдегидом, отмывают, готовят препараты на стекле, фиксируют и красят, как указано на стр. 61.

Под иммерсией светового микроскопа находят не менее 200 лимфоцитов, считая Т-лимфоцитами клетки, присоединившие три и более ЭБ (Е-РОК); В-лимфоцитами — присоединившие три и более частиц зимозана ($ЗС_3$-РОК). Выводят процент Е-РОК и $ЗС_3$-РОК.

Клинические значения показателей. В настоящее время известно, что предшественниками Т- и В-лимфоцитов являются недифференцированные стволовые элементы, генерируемые костным мозгом. Т-лимфоциты, дифференцированные в тимусе, ответственны за развитие клеточного иммунитета, играющего определенную роль в гиперчувствительности замедленного типа и в трансплантационном иммунитете. Они являются антигенреактивными клетками и составляют большинство среди циркулирующих лимфоцитов. Механизм Т-клеточного иммунитета пока недостаточно изучен. Известно, что Т-клетки способны распознавать антигены, активироваться под воздействием антигена и секретировать лимфокины, передавать антигенную иформацию макрофагам («премирование» антигеном макрофагов) — при этом происходит взаимная активация макрофагов и Т-клеток (проявлять цитотоксичность, осуществлять противоопухолевую активность).

Т-клеточный иммунитет у сельскохозяйственных животных находится в начальной стадии изучения. У телят к моменту рождения клеточные факторы иммунитета сформированы и количество циркулирующих Т-лимфоцитов в крови в первые дни жизни составляет 48—62% (Е-РОК), у ягнят — 85,6% (по тесту цитотоксичности), у взрослых коров — 48,85±3,27% Е-РОК.

Известны иммунодефицитные состояния, связанные с функциональной неполноценностью Т-системы. У животных с таким дефектом резко снижается резистентность, чаще всего такие индивидуумы нежизнеспособны.

В-лимфоциты являются основными антителопродуцентами. После кооперативных взаимодействий с Т-клетками они подвергаются сложной трансформации, в результате чего появляются клетки, секретирующие специфические антитела. Недостаточность системы В-лимфоцитов приводит к иммунодефицитным состояниям — в крови либо отсутствуют иммунные глобулины, либо количество их

снижается (гипогаммаглобулинемия или агаммаглобулинемия). У животных с таким недостатком понижена устойчивость к инфекциям, они часто болеют. У телят активное функционирование антитела синтезирующих клеток начинается с 35—40-дневного возраста, хотя способность к образованию иммунных глобулинов со свойствами антител имеется еще во внутриутробном периоде развития. Количество В-лимфоцитов ($ЗС_3$-РОК) в крови у телят составляет 9—18%, у ягнят — 12,7%. Характерные особенности розеткообразования Т-лимфоцитов (Е-РОК) с ЭБ и В-лимфоцитов см. цв. табл. VII—VIII.

Источники: 66, 78.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ И МОЧИ У ТЕЛЯТ

Общие положения. Установление границ колебаний основных физиологических показателей у новорожденных телят и в ранний период их жизни представляет определенный научный и практический интерес. Телята относятся к зрелорождающимся (матуронатным) животным, способным сразу же после рождения осуществлять самостоятельно целый ряд жизненно важных функций. В зависимости от генетической детерминированности, условий внутриутробного развития (что связано с условиями обитания микропопуляции — стада) широта дисперсии того или иного признака (показателя) варьирует в известных пределах. С биологической точки зрения варьирование признака в группе новорожденных, находящихся в одних и тех же условиях, является отражением индивидуальной адаптивной способности или в конечном счете отражением эволюционизирующего влияния среды.

Полиморфизм структуры постнатальных адаптивных реакций более выражен при неблагоприятных условиях обитания. Это дает основание считать, что широта дисперсии признака характеризует адекватность условий и может служить способом их оценки.

Признаки наиболее варьирующие выполняют оперативную роль. Например при становлении температурного гомеостаза (поддержания постоянства температуры тела) в первые 1—4 ч жизни устанавливают достоверные индивидуальные различия, характеризующие физиологическую способность новорожденных к теплопродукции, адекватной теплопотерям.

Телята рождаются агаммаглобулинемичными: в их крови отсутствуют иммунные глобулины, играющие роль антител. Гуморальный иммунитет — колостральные иммуноглобулины — в ранний период жизни имеют временный характер. Самые долгоживущие иммунные белки молозива — IgG; период полураспада у них 21—23 дня, а у остальных значительно меньше. Распад иммунных глобулинов молозива активирует синтез собственных белков, который у телят окончательно формируется в возрасте 6—7 нед. Период между потерей большинства иммунных колостральных белков и достаточным синтезом собственных антител имеет большое значение для животных, так как является критическим в отношении их устойчивости к бактериально-вирусным инфекциям.

33. Клеточный состав крови новорожденных телят

Клетки крови	Возраст в днях		
	1 (до поения молозивом)	2 — 5	9 — 12
Лейкоциты в 1 мкл	5000 — 9300	7800 — 9500	9300 — 12 500
Эритроциты в 1 мкл	$5,08 \cdot 10^6$ — $7,29 \cdot 10^6$	$4,9 \cdot 10^6$ — $6,44 \cdot 10^6$	$6,38 \cdot 10^6$ — $6,75 \cdot 10^6$
Гемоглобин (г/100 мл)	10,65 — 11,44	9,0 — 11,44	11,4 — 12,05

Возрастная динамика физиологических, биохимических и иммунологических показателей у животных в ранний период жизни отражает процессы становления организма, формирование динамического постоянства внутренней среды, называемого гомеостазом. В этом основное отличие в понимании значения тех же самых показателей у новорожденных животных от взрослых.

В таблице 33 представлены величины и пределы колебаний клеточного состава крови телят в возрасте с момента рождения (до поения молозивом) до суточного возраста. Методы определения их не отличаются от общепринятых методов исследования крови. Однако следует учитывать, что при взятии крови у новорожденных телят применение гепарина (особенно с консервантами так называемыми «для ветеринарных целей») вызывает быстрое старение клеток, особенно нейтрофилов, частичный гемолиз эритроцитов. Частичный гемолиз эритроцитов происходит от применения стабилизаторов, не сбалансированных по pH и осмоляльности. При морфологических исследованиях следует брать не стабилизированную, а свежевзятую капиллярную кровь (например, из капиллярного уха).

Значительные потери клеток происходят вследствие прилипания их к стенкам стеклянных (не обработанных специально) пробирок. Травмирование тканей при взятии крови (сдавливание, массаж, перетягивание сосудов и т. д.) искажает клеточный состав крови.

Клинико-физиологическое значение показателей. Лейкоциты, циркулирующие в периферической крови, обусловливают оперативную защиту организма от чужеродных антигенных воздействий, количество их связано с уровнем резистентности организма. Лейкоцитарная реакция организма на воздействия извне имеет фазный характер и отражает уровень и степень адаптивных проявлений организма.

К моменту рождения телят циркулирующие лейкоциты имеют определенную специализацию — моноциты и полиморфноядерные клетки (нейтрофилы, эозинофилы) обладают фагоцитарной активностью, лимфоциты (Т- и В-популяции) осуществляют клеточный гуморальный иммунитет. Пониженное содержание лейкоцитов (менее 5000 в 1 мкл) свидетельствует о снижении резистентности организма и может быть связано с хроническими и острыми интоксикациями, поражениями паренхимы печени, вирусными и бактериальными инфекциями, в определенной стадии стрессовой реакции. У телят может наблюдаться как ответная стрессовая реакция при мечении, связанном с нанесением травм ушных раковин.

Повышенное содержание лейкоцитов (15 000—18 000 в 1 мкл) связано с определенными (чаще всего начальными) стадиями острых бактериальных заболеваний, органными либо системными поражениями. Умеренное повышение числа лейкоцитов может иметь метаболический характер, например, после приема первых порций молозива.

Количество эритроцитов в крови и содержание гемоглобина у новорожденных связано с характером внутриутробного развития, обеспеченностью стельных коров полноценным кормлением, моционом. Гипохромные анемии могут возникать при дефиците железа, меди, избытке некоторых микроэлементов (молибдена) либо при хронических и острых интоксикациях, сопровождающихся поражением органов кровотворения либо вызывающих повышенный распад эритроцитов. Гипоксические состояния новорожденных (длительные тяжелые роды, узкий таз) могут менять показатели красной крови. Умеренные гипоксии повышают количество эритроцитов периферической крови (компенсаторная реакция), тяжелые гипоксии сопровождаются повышенным разрушением эритроцитов.

В последующие дни жизни у нормально родившихся телят показатели красной крови менее лабильны.

При дегидратации организма происходит относительное увеличение показателей красной крови. То же наблюдается в определенные стадии заболеваний дыхательных путей (начальная, компенсаторная реакция).

Морфологический состав клеток белой крови у телят в возрасте от момента рождения до 10—12 дней представлен в таблице 34.

Клиническое значение показателей. *Нейтрофилы* являются высокоспециализированными клетками крови, осуществляющими защитные функции организма за счет фагоцитоза и способности вырабатывать бактерицидные вещества (лизоцим), антитоксические вещества, пирогенные факторы. В лизо-

34. Процентное соотношение лейкоцитов в крови телят

Возраст	Лейкограмма							
	базофилы	эозинофилы	нейтрофилы				лимфоциты	моноциты
			миелоциты	юные	палочкоядерные	сегментоядерные		
2 — 3 ч до поения молозивом	0—0,1	0—2,5	0—0,1	5—18	8 — 21	46 — 64	7,5—18,5	0 — 1,0
2 — 5 дней	0—0,2	0—3,6	0—0,1	5—15	10 — 24	27 — 59	20—36	0 — 4,[illegible]
9 — 12 дней	0—1,0	0,5—6	0—0,1	1—4	1 — 6	24 — 62	20—64	1 — 5

сомах нейтрофилов имеется набор различных гидролитических ферментов (фосфатазы, неспецифические эстеразы и др.). Щелочная фосфатаза принимает участие в обмене липидов и фосфорсодержащих соединений. Энергетические затраты при функционировании нейтрофилов, особенно в неблагоприятных условиях, обеспечиваются запасом гликогена, распадающегося по пути анаэробного гликолиза. Степень созревания нейтрофилов связана с морфологическими изменениями их ядра, в связи с чем (по возрастанию зрелости) различают юные, палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы. Соотношение молодых и зрелых форм, циркулирующих в периферической крови, имеет определенное диагностическое значение. Появление более молодых форм, вплоть до миелоцитов, обычно связано с начальными стадиями инфекционного процесса (при этом происходит и увеличение числа лейкоцитов), токсическими эндо- и экзовоздействиями, сопровождающимися раздражением кровотворной ткани. Уменьшение числа циркулирующих нейтрофилов связано с угнетением их миграции и чаще всего вызывается химическими факторами экзо- или эндогенного происхождения, острыми вирусными заболеваниями.

Лимфоциты — их функциональная роль и клиническое значение см. стр. 221

Эозинофилы участвуют в обмене гистамина, в аллергических реакциях, сорбируют на своей поверхности антигены и переносят их в лимфатические узлы, способствуя выработке антител. У новорожденных телят содержание эозинофилов в крови коррелирует с уровнем адаптивных (стрессовых) реакций. Увеличение количества эозинофилов после перенесенных заболеваний является благоприятным признаком. (У более взрослых животных это может быть связано с аллергическими реакциями, паразитарными заболеваниями, с воздействием некоторых химических веществ, обладающих аллергенными свойствами.) Уменьшение эозинофилов, вплоть до исчезновения их из периферической крови, совпадает со стрессовыми реакциями, например в начальной стадии заболевания при нанесении болевых раздражений, грубой фиксации, обездвиживании теленка, мучении, сопровождающемся травмой ушных раковин и кровотечением и др.

Базофилы в периферической крови новорожденных телят встречаются крайне редко, участвуют они в аллергических реакциях. В гранулах базофилов обнаружен гепарин.

Моноциты — наиболее крупные клетки периферической крови. Пребывание и циркуляция их в периферической крови являются временными, как фаза созревания и формирования системы макрофагальной защиты организма. Моноциты способны к фагоцитозу корпускулярных чужеродных частиц, детрита и измененных собственных клеток. Участвуют в осуществлении клеточного и гуморального иммунитета.

Биохимические показатели сыворотки крови телят даны в таблице 35.

Объем циркулирующей крови у новорожденных телят несколько больший, чем у взрослых животных, относительно массы тела. В возрасте от 1 до 90 дней объем плазмы и крови равномерно уменьшается. Так, у теленка в возрасте 1 дня объем плазмы 63 мл/кг, а крови — 93 мл/кг, в 8 дней — соответственно 58 и 86, в 16 дней — 59 и 84, в 30 дней — 57 и 79, в 60 дней — 50 и 70, в

35. Пределы колебаний биохимических показателей в сыворотке крови телят

Показатели	Возраст телят в днях		
	1 — 3 ч до поения молозивом	2 — 5 дней	9 — 12 дней
NH группы, мкмоль/100 мл		28,1 — 57,9	36,0 — 61,8
Глюкоза, мг %	70,63 — 101,18	80,54 — 89,72	75,49 — 78,73
ммоль/л	3,92 — 5,62	4,470 — 4,980	4,19 — 4,37
Мочевина, мг %	15,37 — 18,85	13,99 — 21,74	21,83 — 21,95
ммоль/л	2,56 — 3,14	2,33 — 3,62	3,635 — 3,655
Мочевая кислота, мг %	0,048 — 0,077	0,65 — 0,81	0,88 — 1,03
мкмоль/л	5,27 — 8,47	72,4 — 89,9	97,7 — 114,1
Креатинин, мг %	1,818 — 1,94	0,969 — 1,14	1,168 — 1,227
мкмоль/л	160 — 171	85,3 — 100,5	102,8 — 108
Билирубин, мг %	0,479 — 0,888	0,274 — 0,479	0,152 — 0,197
мкмоль/л	8,2 — 15,2	4,7 — 8,2	2,615 — 3,385
Натрий, мг %	320 — 333,81	319,53 — 324,6	313,03 — 319,9
ммоль/л	139,9 — 145,3	138,8 — 141,7	136,2 — 139,8
Калий, мг %	21,6 — 22,6	23,86 — 26,43	23,84 — 29,11
ммоль/л	5,55 — 5,81	6,115 — 6,755	6,110 — 7,460
Кальций, мг %	8,00 — 10,1	10,74 — 12,62	10,42 — 10,94
ммоль/л	2,00 — 2,52	2,687 — 3,157	2,605 — 2,735
Хлориды, мг %	3,40 — 4,19	3,62 — 3,94	3,46 — 3,68
ммоль/л	96,0 — 118,4	102,4 — 111,3	97,78 — 103,9
Магний, мг %	3,1 — 3,3	3,3 — 3,4	3,2 — 3,4
ммоль/л	1,27 — 1,35	1,35 — 1,39	1,31 — 1,39
Фосфор неорганический, мг %	5,2 — 6,8	4,8 — 7,4	4,5 — 6,8
ммоль/л	1,6 — 2,1	1,5 — 2,3	1,4 — 2,1
pH цельной крови	7,35 — 7,40	7,38 — 7,41	7,35 — 7,41
Нейраминовые кислоты, мг %	111,2 — 128,6	104,24 — 110,54	73,53 — 80,13
Лизоцим, мкг/мл	11,31 — 12,69	12,3 — 12,7	12,79 — 14,01

90 дней — 48 и 68. В процентах к массе тела это составляет: при рождении — 6,3 и 8,4, в возрасте 1 дня — 6,5 и 9,3, а в возрасте 90 дней — 4,9 и 7.

Белковый состав сыворотки крови. В сыворотке крови новорожденных телят имеются лишь следовые количества иммунных глобулинов. Синдесмохориальный тип плаценты исключает прямой переход белков из крови матери к плоду. Однако сам плод обладает выраженной иммунореактивностью. В возрасте 55—59 дней иммунокомпетентные клетки способны к синтезу низкоспецифичных иммунных белков типа гамма-глобулинов М, которые обнаруживаются иммунофлуоресцентными методами на мембране клеток.

Иммунные сывороточные глобулины этого класса выявляют в возрасте плода около 130—135 дней. В этот период начинают синтезироваться на поверхности клеток более специфичные иммуноглобулины класса G, а в сыворотке крови их можно обнаружить в возрасте 140—145 дней. В 150—155-дневном возрасте у плода синтезируются иммуноглобулины трех классов: А, М и G, антительная специфичность их направлена против групповых антигенов крови матери. Пока неясно, каким образом эта иммунная информация передается плоду. В 170—175-дневном возрасте начинает формироваться лимфоидная ткань пищеварительной системы, по-видимому, активации ее способствует заглатывание околоплодных вод. К моменту рождения у теленка формируются система фагоцитоза и клеточный иммунитет. Гуморальный иммунитет имеет как бы «ждущий» характер. При воздействии антигена плод способен к образованию сывороточных антител, однако система недостаточно сформирована и, по-видимому, не обладает высокой потенцией.

Важным моментом в формировании функциональной способности иммунной системы является своевременный (ранний) прием первых порций молозива, который оказывает тахифилаксигенный эффект, активируя клеточные факторы иммунитета. Степень сорбции иммунных колостральных глобулинов имеет большую индивидуальную особенность и в меньшей мере связана с качеством молозива, что установлено при скармливании смеси молозива коров-матерей одновременно родившимся телятам.

Собственный синтез антител, достаточный для гуморальной защиты, начинается в возрасте 6—7,5 нед (ориентировочно к периоду удвоения массы тела) (табл. 36).

36. Концентрация альбумина, альфа-, бета- и гамма-глобулина в сыворотке крови телят в возрасте от рождения до 8 мес.

Возраст телят (сут)	Фракции белков сыворотки крови г/100 мл			
	альбумин	альфа-глобулин	бета-глобулин	гамма-глобулин
При рождении	2,1—2,5	1,2—1,6	0,5—0,7	0,1—0,3
1—5	1,9—2,5	1,1—1,5	0,7—1,3	2,0—0,6
6—10	2,1—2,5	1,0—1,2	0,9—1,3	0,4—1,6
11—15	2,2—2,6	0,8—1,2	0,7—1,1	0,3—1,3
16—25	2,3—2,9	0,8—1,0	0,8—1,2	0,5—1,3
26—35	2,8—3,0	0,8—1,0	0,8—1,2	0,6—1,2
26—45	2,7—2,9	0,8—1,0	0,8—1,0	0,6—1,2
120—240	2,9—3,3	0,8—1,0	0,6—1,2	1,2—1,8

Выделительная система у новорожденных телят обладает меньшей функциональной способностью по сравнению со взрослыми животными. Почки в первые дни жизни могут пропускать молекулы белков, вплоть до глобулинов, особенно если теленок перенес гипоксию при рождении, а альбумины в моче встречаются в индицируемых количествах у большинства новорожденных телят в первые 2 сут жизни. Концентрационная способность почек низкая, вследствие чего моча имеет пониженную плотность (г/см^3) — 1,011—1,014. Объем выделяемой мочи за сутки у теленка в первые дни жизни составляет около 3,5—5 л и зависит от окружающей среды, кратности поения молозивом, стрессовых воздействий и др. pH мочи колеблется в значительных пределах, до поения молозивом этот показатель в большей мере зависит от уровня внутриутробной гипоксии и гипоксии, перенесенной при родах. Чаще всего pH кислый (5,8—6,2), но после приема молозива он начинает приближаться к нейтральному или слабощелочному. Одновременно повышается плотность мочи в результате увеличения концентрационной способности почечных канальцев. В первые дни жизни преобладают процессы катаболизма; степень выраженности его существенно влияет на состав мочи, на содержание и распределение азотистых соединений (табл. 37).

Источники: 20, 21, 26, 116.

37. Показатели мочи телят

Возраст, мес	Общий азот, %	Азот, % к общему азоту мочи				
		аммиака	мочевины	мочевой кислоты	креатина	креатинина
1	0,74—0,85	4,8—6,7	32,9—43,8	0,42—0,60	2,4—2,8	2,2—2,8
2	0,62—0,82	4,4—6,8	44,6—57,4	0,30—0,40	2,1—2,4	1,5—2,1
3	0,75—0,81	3,3—3,4	51,6—53,1	0,3	1,8—2,1	2,0—2,4

РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА ГОРМОНОВ

Основные принципы радиоиммунологического анализа (РИА). Радиоиммунологический метод относят к группе методов связывания (сатурационного анализа), в которых количественное определение какого-то вещества основано на постепенном насыщении связывающего агента и последующем измерении его распределения между свободной и связанной фазами. В радиоиммунологическом методе в качестве связывающего агента используются антитела, в методе конкурентного связывания — связывающие белки плазмы, в рецепторном методе — природные клеточные рецепторы.

В радиоиммунологическом анализе сочетается специфичность, свойственная реакциям антиген — антитело, с чувствительностью и простотой, что дает применение радиоактивной метки. Классические химические методы неприемлемы для определения белковых и полипептидных гормонов. Этому препятствуют отсутствие каких-либо значительных специфических особенностей в структуре гормонов и их ничтожные концентрации по сравнению с другими сывороточными белками.

Наилучшим способом извлечения белковых гормонов из плазмы является высокоспецифическая иммунореакция, которая лежит в основе РИА. Чувствительность радиоиммунологического метода на несколько порядков выше существующих иммунологических методов, что позволило проводить количественный анализ в малых объемах плазмы и сыворотки крови животных и других биологических жидкостях. Однако при всех достоинствах данного метода у него есть один недостаток, о котором практическому работнику всегда нужно помнить. Суть его заключается в различной устойчивости белковых гормонов к инактивации их биологической активности и антигенных свойств ввиду различия центров молекулы, ответственных за ее антигенные свойства и биологическую активность. Биологическая активность белкового гормона является гораздо более тонкой, легко повреждаемой функцией. В организме же всегда присутствуют инактивированные белковые гормоны с сохраненными антигенными свойствами. Поэтому результаты радиоиммунологического определения белковых гормонов бывают, как правило, выше биологического тестирования.

Для проведения радиоиммунологического анализа необходимо иметь соответствующие антисыворотки и меченые антигены. Чувствительность метода и достоверность результатов в значительной мере возрастают при использовании антител высокой аффинности и низкой перекрестной реактивности, а также меченых антигенов с высокой удельной радиоактивностью.

Взаимодействие антигена с антителом представляет собой обратимую реакцию с образованием комплекса антиген — антитело. Схематично это можно представить уравнением: $Ag + At \underset{K_2}{\overset{K_1}{\rightleftarrows}} Ag{-}A$.

В этом уравнении K_1 обозначена константа скорости прямой реакции по образованию комплекса антиген — антитело, а K_2 — константа скорости диссоциации этого комплекса на исходные компоненты. Константа любой реакции показывает, какая доля молекул вступает в реакцию в единицу времени. Абсолютная скорость, то есть число молекул, реагирующих в единицу времени, зависит от концентрации этих молекул. Следовательно, после добавления в реакционную среду антигена и антител скорость прямой реакции будет гораздо

больше, чем обратной. В результате преобладания скорости прямой реакции будет накапливаться комплекс антиген — антитело. Это, в свою очередь, повлечет увеличение скорости обратной реакции. Такое состояние будет продолжаться до установления равновесия между скоростью образования комплекса Ат — Ат и его диссоциацией. Согласно закону «действующих масс» в состоянии равновесия отношение произведений концентраций в обеих частях уравнения является постоянной величиной, обозначаемой обычно буквой К.

$$\frac{[Ag - At]}{[Ag] \cdot [At]} = K,$$

где Аг — концентрация свободного антигена; Ат — концентрация свободных антител; Аг — Ат — концентрация комплекса антиген — антитело. Величина К представляет собой константу равновесия, характеризующую сродство антитела к антигену. Отсюда вытекает, что при неизменном количестве антител и заданной величины К отношение связанного антигена к свободному в состоянии равновесия будет находиться в количественной зависимости от суммарного количества антигена. Разделив связанную и свободную фазы антигена, можно установить концентрацию антигена в исходном растворе. Поскольку одним из основных требований радиоиммунологического анализа является идентичность меченого и немеченого лиганда (антигена), то закон действия масс полностью применим для системы, в которую наряду с немеченым антигеном вводят меченый лиганд Ag^+. В данном случае основное уравнение реакции примет следующий вид:

$$\begin{matrix} Ag^+ \\ Ag \end{matrix} + At \underset{K_2}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} (Ag^+ - At) + (Ag - At).$$

В радиоиммунологическом анализе применяют избыток концентрации антигена, в результате чего процент связывания неизменного количества меченого лиганда будет зависеть от переменной концентрации немеченого антигена:

$$\begin{matrix} Ag^+ \\ Ag \end{matrix} + At \underset{K_2}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} \begin{matrix} Ag^+ - At \\ Ag - At \end{matrix} + Ag^+ - Ag.$$

Чем больше будет концентрация в системе немеченого лиганда, тем меньше мест связывания остается занятыми меченым лигандом, и, наоборот, снижение уровня немеченого лиганда будет способствовать заполнению мест связывания меченым антигеном. Таким образом, если содержание меченого гормона в каждой пробе будет постоянно, а концентрацию измеряемого гормона постепенно увеличивать, то количество меченого гормона в комплексе гормон — антитело станет соответственно уменьшаться.

Количество гормона в биологических жидкостях определяют по калибровочной кривой, для построения которой предварительно подбирают рабочую концентрацию связывающего агента — концентрацию антител, при которой связывается приблизительно 50% метки. Затем проводят инкубацию фиксированных количеств меченого антигена и антител с различными концентрациями немеченого стандартного гормона.

Радиоиммунологический анализ и построение калибровочной кривой начинают с разведения меченого лиганда буферным раствором, содержащим, как правило, бычий сывороточный альбумин (БСА) в количестве 1—2 мг/мл. Концентрацию меченого гормона доводят до 10—20 тыс. импульсов за 10 с в 100 мкл раствора. Установив рабочее разведение для меченого лиганда, приступают к подбору рабочего разведения для связывающего агента (антисыворотки). Осуществляют это путем двукратных разведений нативной антисыворотки с последующей инкубацией каждого разведения с меченым гормоном в рабочей концентрации. Для разведения антисыворотки используют чаще всего 0.05 моль фосфатный буфер, pH 7,5, содержащий 1—2 мг/мл бычьего сывороточного альбумина. После инкубации разделяют свободный и связанный лиганд одним из способов, описанных ниже, пробы радиометрируют. То разведение антисыворотки, которое связывает 50% меченого лиганда выбранной концентрации, является рабочим титром.

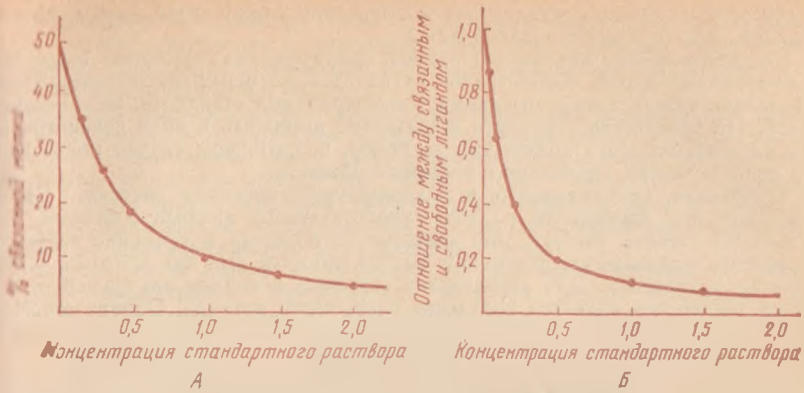


Рис. 13. Калибровочная кривая в арифметической шкале концентрации стандартного раствора.

Для построения калибровочной кривой готовят серию разведений стандартного гормона с таким расчетом, чтобы центральная ее часть соответствовала концентрации определяемого гормона (это соответствует наибольшей чувствительности и точности метода). В дубликаты пробирок приливают затем равное количество (обычно по 100 мкл) нужных разведений стандартного гормона. Одна пара пробирок служит в качестве нулевой пробы (концентрация исследуемого гормона в ней равна нулю), а другая пара — в качестве холостой пробы (в нее не добавляют впоследствии антисыворотку). Затем в каждую пробирку вносят равное количество связывающего агента, тоже в рабочем разведении. Пробы инкубируют (условия инкубации зависят от вида лиганда, который в каждом конкретном случае подбирают специально). После инкубации связанный и свободный лиганд разделяют одним из описанных ниже способов и осадки радиометрируют. Полученные результаты выражают в виде графика; по оси ординат откладывают процент связанной метки, а по оси абсцисс — концентрацию стандарта. Определив для неизвестного образца процент связанной метки, по калибровочной кривой находят концентрацию исследуемого гормона. График калибровочной кривой строят либо в арифметической шкале концентраций стандартов (рис. 13), либо полулогарифмическим способом (рис. 14). Оба способа построения просты и наглядны, и предпочтение какого-либо является делом выбора исследователя.

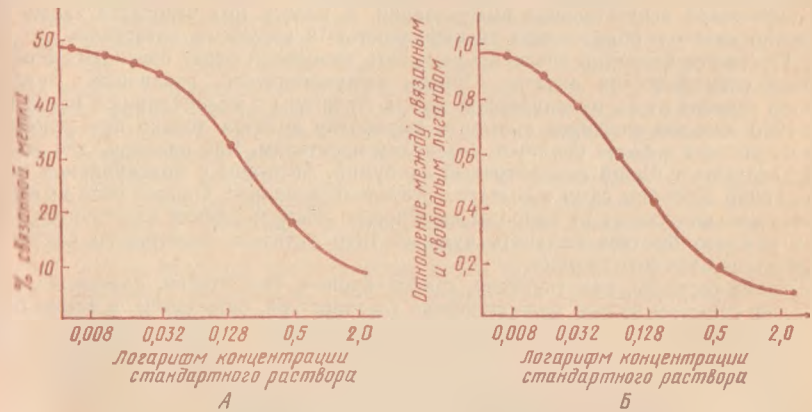


Рис. 14. Калибровочная кривая в полулогарифмической шкале концентрации стандартного раствора.

По оси ординат обычно откладывается отношение между связанным и свобо[illegible] лигандом либо процент связанной метки.

Следует помнить, что наклон кривой графиков, на которых использу[illegible] арифметическая шкала концентраций стандартов, не отражает эксперименталь[illegible]го различия между двумя соседними концентрациями стандарта. Необходимо [illegible]метить, что количество стандарта желательно выражать в виде концентрации [illegible] не в виде абсолютного количества на пробу, в противном случае могут воз[illegible]нуть недоразумения, связанные с конечным объемом.

Требования, предъявляемые к радиоиммунологическому методу. Основ[illegible] требование при проведении радиоиммунологического анализа — наличие ли[illegible]да высокой степени чистоты. Без очищенного антигена в принципе невозмо[illegible] разработать радиоиммунологический анализ, который был бы пригоден для пр[illegible]тического применения. Для определения гормонов в данном случае одной из [illegible]новных трудностей является получение очищенного лиганда. Однако стероид[illegible] и тиреоидные гормоны нужной степени чистоты уже доступны для широкого пр[illegible]менения в практике, так как их производство уже налажено синтетическим пу[illegible]рядом фирм. Что касается белковых гормонов, то их приходится выделять [illegible] биологических источников. Особенно трудно исследовать гормоны передней [illegible] гипофиза; прежде всего это относится к гликопротеидам (лютеинизирующий [illegible]мон — ЛГ, фолликулостимулирующий — ФСГ и тиреотропный — ТТГ), антисы[illegible]ротки к которым обладают значительным перекрестным действием. Для полу[illegible]ния требуемой специфичности антисыворотки к этим гормонам приходится поч[illegible] всегда осветлять, то есть истощать к гормону, к которому проявляется перекре[illegible]ная реакция. Все гормоны перед использованием в качестве стандартов пред[illegible]рительно проверяют на их биологическую активность, сравнивая с междупаро[illegible]ными стандартами.

Препараты, применяемые в радиоиммунологическом методе, хранят при — [illegible] Замораживание рекомендуют проводить очень быстро, так как при медлен[illegible] охлаждении вещества частично могут разрушаться из-за образования больш[illegible] кристалликов льда. Для этого пользуются жидким азотом или смесью сух[illegible]льда с ацетоном. Чтобы избежать повторных размораживаний препаратов, ко[illegible]рые приходится в процессе работы часто извлекать из холодильника, их пред[illegible]рительно разливают па аликвоты. Белковый материал при —20° лучше сохран[illegible]ется при концентрации белка более 1 мг/мл, если меньшая концентрация, то [illegible] препарату добавляют белок-носитель — обычно очищенный БСА.

Связывающий агент (антисыворотка). Специфичность и точность радиоим[illegible]нологического анализа прежде всего зависят от качества используемых анти[illegible]вороток. Чувствительность метода прямо пропорционально связана со сродст[illegible] антител к лиганду. Иммуноглобулины делят на пять классов — IgG, IgM, Ig[illegible] IgД, IgE, но для радиоиммунологического анализа интерес представляет толь[illegible] IgG, поскольку он включает огромное большинство антител, образующихся [illegible] специфической искусственной иммунизации. К классу IgG относится также б[illegible]шинство антител, обладающих специфичностью к вирусным антигенам.

Почти все вещества способны вызывать иммунный ответ организма с обра[illegible]ванием специфических антител. Причем иммуногенность различных антиге[illegible] сильно зависит от их молекулярной массы. Антигены с молекулярным весом ме[illegible]ше 1000 дальтон способны вызывать выработку антител только при условии [illegible] присоединения к более крупным молекулам-носителям. Как правило, для этих [illegible]лей используют бычий сывороточный альбумин. Антигены с молекулярной мас[illegible] более 5000 способны сами вызывать антителообразование. Однако сила иммун[illegible] ответа сильно зависит от природы иммуногена. Использование адъювантов по[illegible]ляет намного быстрее получить нужный титр антител, значительно снизив п[illegible] этом количество иммуногена.

Такие гормоны, как тироксин, трийодтиронин, тестостерон, адреналин, нор[illegible]реналин, гормоны задней доли гипофиза (вазопрессин, окситоцин), а также кор[illegible]костероиды, в силу своей относительно малой молекулярной массы являю[illegible] гаптенами. Кроме того, данные соединения, в норме присутствуя в организме к[illegible]дого животного, совершенно лишены видового различия. Поэтому получение [illegible]тител к этим гормонам является задачей довольно сложной и всегда связанно[illegible] выработкой аутоантител у животного-продуцента против идентичных собст[illegible]ных гормонов.

Для успешной иммунизации животных данными веществами обязательным является их конъюгирование с носителями, например с бычьим сывороточным альбумином. Существует множество методов, позволяющих образовать связь между гаптеном и молекулой белка.

Наибольшее распространение получили внутрикожный и подкожный методы введения антигена, а в последнее время — внутриузелковый (прямое введение вакцины в лимфатические узлы). Антисыворотку отбирают при достижении ею необходимого титра. Критериями при таком отборе являются специфичность, сродство и титр, причем основным является специфичность. Если антисыворотка не обладает необходимой специфичностью, то она не годится для радиоиммунологического анализа независимо от ее сродства и титра.

Чувствительность метода тесно связана со сродством антитела к антигену, при этом концентрация определяемого антигена может составлять лишь 10^{-9} моль/л. Практически для антител, используемых в радиоиммунологическом анализе, чувствительность лежит в пределах 10^{-9} — 10^{-12} моль/л. От сродства зависит также и титр антител. Для радиоиммунологического анализа отбирают специфические антисыворотки с максимальным титром антител.

Антисыворотку хранят при —20°С, предварительно разделив ее на аликвоты, чтобы избежать вредного воздействия процесса замораживания — размораживания. Размороженную порцию хранят, как правило, при 2—4°С с добавлением азида натрия или мертиолата (0,1%). При этих условиях антисыворотка остается пригодной для РИА в течение 3—6 мес.

Меченый лиганд. В радиоиммунологическом анализе лиганд метят с тем, чтобы определить содержание в системе свободного и связанного лиганда. Меченый лиганд по своим антигенным свойствам не должен отличаться от немеченого. Если у меченого лиганда изменяются антигенные свойства, то это повреждение принято считать введением метки.

Все используемые в РИА меченые лиганды делят на две группы: 1) лиганды, содержащие внутреннюю метку, и 2) лиганды с искусственно введенной внешней меткой. К лигандам с внутренней меткой относятся стероидные гормоны, у которых во время искусственного их синтеза один или несколько атомов стабильных изотопов углерода или водорода замещены на радиоактивные изотопы (^{14}C вместо ^{12}C или ^{3}H вместо ^{1}H). Лиганд с внутренней меткой химически идентичен немеченому.

В случае внешней метки один или несколько атомов в молекуле лиганда заменяются атомами радиоактивного изотопа другого элемента. Чаще всего для этого используют ^{131}I или ^{125}I, которые соединяются с молекулой лиганда ковалентной связью. Главное требование к таким соединениям — сохранение сродства к связывающему агенту, поскольку в данном случае меченый и немеченый лиганды химически неидентичны. Для практики большой интерес представляют лиганды второй группы, поскольку в лаборатории можно получить меченные изотопом йода в основном любые биологически активные соединения.

В настоящее время белковые и полипептидные гормоны метят только изотопами ^{125}I или ^{131}I. Разработано много методов йодирования гормонов. Общим для них является превращение отрицательного иона йода (I^-) в более реакционноспособные формы (свободный йод или положительно заряженный ион йода — I^+). По своей простоте, доступности и хорошим результатам наиболее широко используют хлораминовый метод, предложенный в 1963 г. Гринвудом и соавт. Методика получения меченого лиганда сводится к смешиванию растворов лиганда, йодистого натрия (содержащего ^{125}I или ^{131}I) и хлорамина Т. При добавлении хлорамина Т ион I^- переходит в свою более реакционноспособную форму — I_2 или I^+. Свободный йод и положительно заряженный ион йода сравнительно легко замещают атомы водорода ароматических колец тирозиновых остатков с образованием стабильного соединения. Скорость замещения атомов водорода в других аминокислотах, в частности в гистидине, в 30—80 раз меньше, чем у тирозина, поэтому йодирование белков идет в основном по тирозину.

Методом Гринвуда нельзя йодировать стероидные и другие небелковые гормоны. Поэтому Болтон и Хантер (1973) предложили универсальный способ введения метки с помощью конъюгации. Здесь йод вначале связывают с промежуточным носителем, содержащим фенольную или имидазольную группу (по которой происходит йодирование), а также аминогруппу для связывания с лигандом или его

производным. При данном методе исключается химическое повреждение антиге[illegible] что отмечают при обычном йодировании.

Поэтому для мечения лабильных белков метод Болтона и Хантера являе[illegible] предпочтительнее. Однако недостатком его служит то, что метка, вводимая в молекулу низкомолекулярного лиганда, может изменить его антигенные свойства вследствие своих больших размеров по сравнению с йодом.

Общий метод опосредованного введения внешней метки в белки. 1. Открывают ампулу, содержащую 1 мКи и N-сукцинимидил-3-(4-окси, 5-^{125}I-йодофенил) пропионата и выпаривают растворитель, направляя на поверхность слабую струю азота.

2. Добавляют в ампулу белок (5 мкг), растворенный в 0,01 мл 0,1 моль/л боратного буфера, pH 8,5, и перемешивают смесь 15 мин при 0°С.

3. Добавляют в ампулу 0,5 мл 0,2 моль/л глицина в 0,1 моль/л боратном буфере, pH 8,5. Смесь выдерживают 5 мин при 0°С (глицин реагирует с исходным сложным эфиром и препятствует его связыванию с белком-носителем).

4. Реакционную смесь пропускают через колонку с сефадексом G=50 или G=75 и полученный меченый белок проверяют.

При йодировании лигандов хлораминовым методом очень важно проводить реакцию в минимальном объеме при возможно большей концентрации в реакционной смеси реагентов. Общий реакционный объем, включающий изотоп, лиганд, хлорамин Т, не должен превышать 100 мкл. Хлорамин Т необходимо брать в минимальной концентрации, поскольку он может повредить лиганд. Обычно его добавляют в количестве 50 мкг, хотя зачастую бывает достаточно 25 и 10 мкг. Очень важным является проведение реакции йодирования при pH близких к 7,5, поскольку это оптимум йодирования тирозиновых остатков. При pH больше 8 может происходить замещение по другим группам, а при pH больше 9 эффективность реакции резко снижается. Изотопы йода поступают в виде растворов в 0,1 моль NaOH, поэтому остальные реагенты добавляют в кислой форме, чтобы после добавления всех реагентов pH среды составлял 7,5.

Чтобы исключить неблагоприятное воздействие хлорамина Т на лиганд, время с начала и до конца реакции не должно превышать 20—30 с. При этом нужно успеть тщательно перемешать реакционную смесь. Что касается температуры проведения реакции, то сильной зависимости от нее качества йодирования нет, поэтому реакцию можно проводить как при пониженной температуре (0°С), так и при комнатной.

После завершения реакции йодирования гормонов реакционную смесь сразу же разбавляют в несколько раз буфером, содержащим альбумины. Это уменьшает возможность повреждения лиганда остатками непрореагировавших реагентов, а также снижает вероятность повреждения молекул лиганда за счет внутреннего облучения. Альбумины же повышают стабильность белков в сильно разбавленных растворах.

Перед использованием меченый лиганд очищают от поврежденных молекул и от остатков непрореагировавшего йода. Это можно осуществить с помощью диализа, адсорбции на КМ-целлюлозе, йонообменной хроматографии, тонкослойной хроматографии, электрофореза, иммунопреципитации и хроматографии методом гель-фильтрации.

Стероидные, тиреоидные гормоны и катехоламины очищают методом тонкослойной хроматографии, но чаще используют метод гель-фильтрации на сефадексах. По графику, построенному в координатах: радиоактивность (имп/сек) — номер пробирки элюата, определяют фракции, содержащие меченый лиганд, свободный от примесей. Этот препарат меченого лиганда должен содержать не более 5% примесей.

Перед использованием в РИА меченый лиганд проверяют на способность к связыванию с антисывороткой. Для этого инкубируют одинаковые количества меченого лиганда с избытком специфической антисыворотки. Осаждают комплекс антиген — антитело и по максимальной радиоактивности осадка выбирают лучшую фракцию элюата для проведения РИА, предварительно ее разбавив буфером, содержащим 2 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина, с таким расчетом, чтобы 0,2 мл полученного раствора давали 10 000 импульсов за 10 с.

Способы разделения свободного и связанного лиганда основаны на их различии в физико-химических свойствах, поэтому более широкое распростране-

ние получили методы адсорбции и, в частности, адсорбция активированным углем и силикатами. Адсорбционные методы просты, исключительно дешевы и обеспечивают проведение этого этапа РИА с достаточной скоростью, однако они не обладают нужной эффективностью. При их использовании приходится тщательно подбирать условия (pH, ионная сила, концентрация белка, температура), чтобы избежать адсорбции комплекса антиген — антитело. Кроме того, адсорбенты могут конкурировать со связывающим агентом за лиганд и вызывать расщепление комплекса.

Мелкозернистые силикаты обладают хорошей адсорбирующей способностью. В радиоиммунологическом анализе применяют тальк, фуллерову землю и флоросил. По принципу действия силикаты практически не отличаются от активированного угля и по своим достоинствам, и по своим недостаткам.

В некоторых случаях эффективен способ фракционного осаждения солями или органическими растворителями. Механизм фракционного осаждения основан на использовании солей и растворителей, которые уменьшают количество свободной воды, обеспечивающей гидратацию присутствующих в растворе биомолекул. При нейтральном значении pH в этих условиях первыми будут выпадать молекулы иммуноглобулинов (имеющих изоэлектрическую точку, близкую к нейтральной), а следовательно и комплекс антиген — антитело, несвязанный лиганд при этом остается в растворе. Для фракционного осаждения чаще применяют сульфат аммония, диоксан и полиэтиленгликоль. Методы фракционного осаждения превосходят все остальные методы разделения свободного и связанного лиганда. Они могут быть использованы почти во всех случаях, за исключением анализа белковых молекул с очень большой молекулярной массой (то есть близких к молекулярной массе иммуноглобулинов).

Разделение свободного и связанного лиганда с помощью полиэтиленгликоля проводят по следующей схеме. 1. Готовят 20%-ный раствор полиэтиленгликоля (молекулярная масса 6000) в фосфатном буфере. 2. Микропипеткой добавляют двойной объем этого раствора к инкубационной смеси при РИА. 3. Тщательно перемешивают полученную смесь на вихревом смесителе до получения опалесцирующего раствора. 4. Центрифугируют 30 мин со скоростью не менее 2000 q. 5. Надосадочную жидкость сливают или отсасывают при помощи водоструйного насоса. 6. Пробирку с осадком просчитывают на гамма-счетчике.

В тех случаях, если применение адсорбционного способа и способа фракционного осаждения дает неудовлетворительные результаты, используют универсальный метод двойных антител.

В последнее время широкое распространение получило использование метода неспецифического связывания антигена стенками полимерных пробирок. В данном случае антитела фиксируются не ковалентными связями, а за счет ионных, гидрофобных и других связей.

Оборудование и принадлежности, необходимые для проведения радиоиммунологического анализа. Универсальность собственно радиоиммунологического анализа позволяет использовать для определения даже различных классов гормонов одно и то же оборудование, что значительно удешевляет и ускоряет анализ веществ.

Обязательным условием для постановки РИА является наличие в лаборатории радиометрического оборудования. Для детектирования изотопов, используемых в качестве внутренней метки (^{3}H, ^{14}C), необходим жидкостно-сцинтилляционный β-спектрометр. Подобное оборудование выпускают фирмы «Intertechnique», «ЛКБ Wallac», «Beckman», и др. В случае применения внешней метки (^{125}I, ^{131}I) детектирование образцов проводят на гамма-счетчиках с кристаллическим сцинтиллятором. Удобны в работе гамма-счетчики, выпускаемые фирмой «ЛКБ Wallac». Наша промышленность для радиоиммунологических исследований выпускает установки «Гамма-1».

При совместном определении тироксина и трийодтиронина в одной и той же пробе рекомендуют гамма-счетчик с дискриминатором, позволяющий проводить раздельное определение ^{125}I и ^{131}I.

Кроме счетной аппаратуры, нужны также: низкотемпературный холодильник (для хранения исследуемых образцов) и бытовой холодильник; смеситель «Vortex» или любого другого типа; магнитная мешалка; автоматические микропипетки (на 100, 500 и 1000 мкл) со съемными наконечниками; пластиковые про-

бирки (желательно одноразовые); центрифуга рефрижераторная любого типа на 100 проб; хроматографические колонки и сефадексы (молселекты) G-10, G-25, G=50, G=75; калькулятор.

При работе с радиоактивными изотопами необходимо соблюдать правила, предусмотренные в ОСП-72. При использовании в качестве метки ^{125}I работают под тягой, поскольку все соединения, меченные этим изотопом, содержат некоторое количество свободного йодида, который при соответствующих условиях может превращаться в свободный йод, способный накапливаться в щитовидной железе.

РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТРИЙОДТИРОНИНА В КРОВИ

Метаболический гормон трийодтиронин (T_3) был впервые идентифицирован Гроссом и Питт-Риверсом в 1952 г. Синтезируется он в щитовидной железе после включения йода, поступающего с кровью в молекулу тирозина, и сопряжения моно- и дийодтирозина. В щитовидной железе T_3 связан с тиреоглобулином, от которого он отщепляется по мере секреции в кровь. Кроме того, значительное количество T_3 образуется из тироксина (T_4) путем периферического дийодирования. Поэтому T_4 можно считать предшественником метаболически более активного T_3.

Примерно 99,5% находящегося в кровотоке T_3 связано с белками сыворотки, а именно с тироксинсвязывающим глобулином, тироксинсвязывающим преальбумином и тироксинсвязывающим альбумином. Концентрация комплекса T_3-тироксинсвязывающий глобулин в крови составляет $^1/_{50}$ часть концентрации комплекса T_4-тироксинсвязывающий глобулин. Период полувыведения из организма T_3 составляет приблизительно 24 ч, а ежедневный обмен — около 50 мкг. Уровень T_3 в сыворотке крови зависит от возраста животного: быстро повышается после рождения и постепенно понижается к старости.

Радиоиммунологическое определение общего содержания трийодтиронина в сыворотке крови с помощью наборов. Для определения T_3 в настоящее время выпускаются различными фирмами специальные наборы, в состав которых входят все необходимые компоненты в готовом виде. Поэтому суть работы сводится только к прибавлению этих компонентов в пробирки в определенной последовательности и обсчету результатов.

Набор T_3-РИА («Изокомерц», ГДР) рассчитан на 100 определений.

1. Антисыворотка к трийодтиронину — лиофилизированная. Растворяют в 11 мл трис-буфера. Способна связывать 30—50% меченого гормона.

2. Сыворотка, свободная от T_3, лиофилизированная. Растворяют в 2 мл дистиллированной воды (содержание T_3 в ней равно 5 нг/100 мл).

3. Стандартный лиофилизированный раствор T_3 в сыворотке. Концентрация T_3 1260 нг/100 мл. Растворяют в 0,5 мл дистиллированной воды. Последовательным смешиванием 0,2 мл стандартной сыворотки с 0,2 мл сыворотки, свободной от T_3, получают серию стандартных растворов с содержанием T_3, равным 632, 319, 162, 83, 44, 25 и 5 нг/100 мл.

4. Раствор ^{125}I-трийодтиронина — 0,5 мл. Разводят в 4,5 мл трис-буферного раствора.

5. Концентрированный трис-буферный раствор — 10 мл. Объем доводят дистиллированной водой до 200 мл.

6. 1-анилиннафталин-8-сульфоновая кислота — 22 мг. Предназначена для инактивирования тироксинсвязывающего глобулина и других транспортных белков в исследуемой сыворотке. Растворяют в 5 мл трис-буферного раствора.

7. Ионообменные полосы — 100 шт.

Техника определения. Готовят рабочий раствор (5 мл меченого разведенного гормона, 23 мл буферного раствора и 5 мл 1-анилиннафталин-8-сульфоновой кислоты), который по 0,3 мл вносят во все тест-пробирки. Туда же прибавляют по 0,05 мл исследуемой сыворотки, а в пробирки, предназначенные для построения калибровочной кривой, — столько же стандартного раствора трийодтиронина, затем 0,1 мл антисыворотки. Одновременно приготавливают пробу

на общую радиоактивность, в которую вместо исследуемой сыворотки вносят 100 мкл трис-буфера, и пробу на неспецифическое связывание — в нее входит 100 мкл сыворотки, свободной от T_3, а вместо антисыворотки — 100 мкл буферного раствора.

Содержимое пробирок тщательно перемешивают и инкубируют 2 ч при комнатной температуре. Затем во все пробирки прибавляют по 1,5 мл трис-буфера и по 1 ионообменной полоске (за исключением пробирок на общую радиоактивность). Пробы перемешивают на ротационном смесителе при комнатной температуре 1 ч. Удаляют пинцетом полосы ионообменника и измеряют общую радиоактивность. Из полученных величин вычитают радиоактивность, обусловленную неспецифическим связыванием. Стандартную кривую строят по величинам $B/B_0 \cdot 100\%$.

Основное показание для количественного определения T_3 связано с диагностикой гипо- и гипертиреоза, особенно T_3-тиреотоксикоза. Нормальный уровень T_3 в сыворотке крови может перекрываться с диапазонами для гипо- и гипертиреоза, поэтому пограничные значения следует интерпретировать с особой осторожностью. Существенные отклонения в уровне T_3 свидетельствуют об изменении способности к связыванию T_3 сывороточными белками.

Тироксин (T_4) и его определение радиоиммунологическим методом. Тироксин вырабатывается только щитовидной железой. Концентрация тироксина в сыворотке регулируется по принципу отрицательной обратной связи посредством тиреотропного гормона гипофиза. У здорового человека щитовидная железа вырабатывает около 80 мкг тироксина в сутки, свыше 99,9% которого связывается с протеинами плазмы крови. Основным связывающим белком плазмы является тироксинсвязывающий глобулин; преальбумины и альбумины также обладают этими свойствами, однако в нормальных условиях на их долю приходится меньшая часть связанного тироксина. Период полувыведения тироксина из организма — около 8 сут. Тироксин считается биологически активным веществом, хотя его рассматривают и как предшественник или депо трийодтиронина, имеющего в пересчете на 1 моль в 4 раза более высокую активность и в 10 раз большую скорость метаболизма.

Основное биологическое действие свободного тироксина совместно с T_3 сводится к интенсификации обмена веществ. Отклонение от нормы отрицательно влияет на все органы, что вызывает нарушение клеточной дифференциации и роста. При аномально низких значениях у молодых животных данных гормонов отмечают нарушения в нервной системе и в росте организма.

Принцип радиоиммунологического определения T_4 сводится к связыванию специфическими антителами избытка T_4—$^{125}I + T_4$—меченого и немеченого лиганда. Чем больше в пробе будет немеченого T_4, тем меньше свяжется с антителами ^{125}I, и наоборот. По калибровочной кривой, построенной в аналогичных условиях, находят количество неизвестного T_4.

Но поскольку T_4 почти полностью связан протеинами-носителями, то при определении необходимо отделить T_4 от белков, что достигается добавлением анилиннафталин-сульфоновой кислоты. Таким образом, без экстракции удается определить содержание T_4 в крови. По окончании реакции между меченым ^{125}I-тироксином и немеченым T_4 с антителами образующийся комплекс — T_4-антитела осаждают полиэтиленгликолем или же используют любой ранее описанный способ разделения свободного и связанного лиганда. После измерения радиоактивности связанного антителами меченого ^{125}I-тироксина по стандартной кривой находят концентрацию тироксина в сыворотке.

Определение T_4 радиоиммунологическим методом аналогично определению T_3.

Серьезного внимания заслуживает РИА функционального состояния щитовидной железы у животных при диспансеризации, а также для определения дозы добавок йодистого калия в районах йодной недостаточности, профилактики нарушения обмена веществ и повышения продуктивности. При йодной недостаточности у коров отмечается ановуляторный цикл, у свиней — рождение мертвых бесшерстных или маложизнеспособных поросят, у кур — резкое снижение яйценоскости. К сожалению, еще нет нормативных показателей уровня T_3 и T_4 животных разных видов с учетом возраста, пола, породы, физиологического состояния и региона. Последнее имеет особое значение, так как в некоторых зонах страны при естественном недостатке йода в почве, воде и кормах у животных

возникает энзоотический зоб. Гипотериоз у сельскохозяйственных животных сопутствует уровской болезни. Как правило, щитовидная железа у животных обладает максимальной активностью зимой и минимальной — летом. Физиологическая гиперфункция щитовидной железы наблюдается при беременности и лактации, особенно у высокопродуктивных коров. Гипофункция щитовидной железы может возникнуть при поедании больших количеств капусты и турнепса, так как в них содержатся антитиреоидные вещества.

РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИРЕОКАЛЬЦИТОНИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ

Тиреокальцитонин образуется в парафолликулярных клетках щитовидной железы. Представляет собой полипептид, состоящий из 32 аминокислот (с молекулярной массой 3607). У этого гормона имеются не сильно выраженные видовые различия, проявляющиеся в неодинаковой последовательности аминокислот в полипептидной цепи. Однако у тиреокальцитонина свиного (синтезированного искусственно) выражена перекрестная реакция с овечьим, что позволяет определять тиреокальцитонин радиоиммунологическим методом как у свиньи, так и у овцы, используя в качестве стандарта и меченого лиганда только свиной тиреокальцитонин.

Принцип — общий для радиоиммунологического метода; в качестве стандарта используют очищенный препарат кальцитонина, полученный из щитовидной железы свиньи (биологическая активность 116 ед/мл по стандарту MRC), или синтетический свиной тиреокальцитонин. Этот же препарат используют и для получения антител. Иммунизацию морских свинок или кроликов проводят конъюгатом кальцитонина с бычьим сывороточным альбумином. Конъюгат получают с помощью глутарового альдегида. 1,5 мг синтетического свиного тиреокальцитонина растворяют в 0,6 мл 0,05 моль фосфатного буфера pH 7,6 и смешивают с 10 мг сывороточного альбумина (БСА), растворенного в 1 мл того же раствора. При постоянном перемешивании прибавляют 0,5 мл 0,021 моль глютаральдегида. Для иммунизации конъюгат растворяют в физрастворе, смешивают с полным адъювантом Фрейнда и иммунизируют кроликов. Курс иммунизации состоит из трех инъекций с интервалом в 2 нед. Сыворотку получают в холодильнике при 4°С. Приготовленную таким образом антисыворотку разводят в 30 000 раз и используют в РИА.

Поскольку тиреокальцитонин сам является антигеном, то антисыворотку к нему можно получать без конъюгирования с сывороточным альбумином. Однако курс иммунизации в данном случае состоит из 10 иммунизаций с 2-недельным интервалом, что влечет за собой повышенный расход дефицитного препарата и значительное увеличение сроков иммунизации.

Антисыворотка в рабочем разведении должна связывать 40—60% меченого ^{125}I-тиреокальцитонина.

Меченый ^{125}I-тиреокальцитонин получают хлораминовым методом по Гринуду и Хантеру. ^{125}I-тиреокальцитонин очищают гельхроматографией на колонке (0,9×15 см) с сефадексом G-25 fine, которую элюируют изотоническим раствором NaCl с 0,25%-ным сывороточным альбумином. Первый пик радиоактивности (7—14-я фракции) соответствует меченому кальцитонину, второй пик (17—21-я фракции) — элементарному ^{125}I. Фракции меченого кальцитонина с самой высокой активностью хранят при —20°С. Если хранение было длительным (более 3-х нед), то накануне анализа меченый гормон подвергает дальнейшей очистке на колонке (1,5×90 см) с сефадексом G=50 fine, элюируя физраствором. Три фракции с самой высокой активностью разводят до активности 5000—10 000 имп/мин в 50 мкл и хранят при —20°С не более недели.

Для разделения свободного и связанного лиганда используют либо активированный уголь, обработанный декстраном, либо порошок талька. Ну, и конечно, в данном случае можно применить универсальный метод двойных антител.

При определении тиреокальцитонина в тест-пробирки вносят по 100 мкл стандартного раствора гормона в концентрации 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 и 1280 пг в 0,1 мл 0,025 моль вероналового буфера, pH 8,6, предназначенного

для построения калибровочной кривой. В другие пробирки вносят по 20 мкл исследуемой плазмы животных. Затем во все пробирки добавляют по 100 мкл раствора меченого кальцитонина и по 100 мкл антисыворотки в рабочем разведении. Во все пробы добавляют вероналовый буферный раствор до конечного объема пробы — 300 мкл. 0,05 моль вероналовый буфер pH 8,6 содержит 0,5% сывороточного альбумина, 0,02% мертиолата и 0,5% смеси ингибиторов пептидаз — инипрол, зимофрен, Е-аминокапроновая кислота. Вместо смеси этих ингибиторов пептидаз можно использовать трасилол или контрикал. Одновременно готовят параллельные пробы, содержащие вместо антисыворотки 100 мкл буферного раствора. Все пробы ставят в дубликатах. Инкубация длится 3—6 сут при 4°С. По окончании инкубации отделяют связанный гормон от свободного, предварительно внеся в каждую пробу по 200 мкл нормальной донорской плазмы и порошок талька (12,5 мг). Через 10—15 мин добавляют по 3 мл 0,1 моль вероналового буфера pH 8,6, смешивают и центрифугируют 15 мин при 3000 g и 4°С. Декантируют надосадки и измеряют радиоактивность осадков. В осадках в данном случае будет находиться не связанный антителами лиганд.

Чувствительность данного метода — 5 пг свиного кальцитонина в пробе.

Клиническое значение количественного определения тиреокальцитонина в крови связано с его важной биологической ролью в регуляции кальциево-фосфорного обмена у животных. Тиреокальцитонин угнетает функцию остеокластов и ослабляет мобилизацию кальция из костей. Он усиленно выделяется в кровь при повышении уровня кальция в крови и поддерживает гомеостаз кальция в организме. Тиреокальцитонин действует противоположно паратгормону. До настоящего времени нормальных показателей этого гормона у животных пока нет. Поэтому при определении уровня тиреокальцитонина необходимо иметь контрольную группу животных. У суягных овец за 10 дней до окота уровень гормона в среднем составил 5 нг/мл, у ягнят — 500 нг/мл.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПАРАТГОРМОНА В КРОВИ

Паратгормон вырабатывается паращитовидной железой. Это белок с молекулярной массой, равной 8500. Основное значение в организме — регуляция кальциево-фосфорного обмена. Удаление паращитовидной железы влечет за собой развитие судорог, тетанию и смерть. Эти изменения вызываются недостатком кальция, нарушением функции почек и других органов.

Регуляция деятельности железы осуществляется непосредственно ионами кальция. Нарушение деятельности желез, ведущее к снижению продукции и секреции паратгормона в кровь, ведет к развитию устойчивой тетании.

При гиперпаратиреозе (повышенной секреции паратгормона) возникает фиброзная остеодистрофия. Избыток паратгормона в этом случае ведет к декальцинации — кости становятся мягкими и ломкими.

Принцип метода определения паратгормона и техника выполнения. Паратиреоидный гормон, представляя собой белковую молекулу, состоящую из 84 аминокислот, уникален тем, что его фрагмент из 33 аминокислот проявляет почти такую же активность, как и вся молекула целиком. Паратгормон обладает еще одним весьма удобным для исследования свойством — он имеет слабовыраженные антигенные различия у разных видов животных и человека. Это позволяет использовать бычий паратгормон в качестве стандарта для построения калибровочной кривой, а антитела, полученные против бычьего паратгормона, — для определения паратиреоидного гормона в сыворотке крови человека.

Аналогичным образом РИА, разработанный для бычьей системы, с успехом можно использовать для определения паратгормона у овец.

Бычий высокоочищенный паратгормон выпускают в Англии. Его можно применять для получения антисыворотки. Однако перед иммунизацией желательно гормон дополнительно очистить. Для иммунизации берут не менее 20 морских свинок, каждой из которых вводят по 1 мг паратгормона с полным адъювантом Фрейнда в объеме 1—2 мл. Иммунизацию повторяют 3—4 раза с месячным интервалом.

Связывающую способность и специфичность антисыворотки проверяют в радиоиммунологической системе. Все ее компоненты разводят 0,05 моль веро-

наловым буфером pH 8,6 и добавляют плазму неиммунизированных свинок в соотношении 5 : 1. Система состоит из 100 мкл меченого паратгормона (с активностью 5000—10 000 имп/мин), 100 мкл антисыворотки в конечном разведении от 1 : 1000 до 1 : 300 000 и буферного раствора с плазмой до общего объема 0,5 мл. Смесь инкубируют в течение 3-х сут при 4°С. Не связанный с антителами лиганд адсорбируют активированным углем, покрытым декстраном в вероналовом буфере.

Для анализа используют антисыворотку с максимальным титром в рабочем разведении, при котором должно связываться в условиях опыта не менее 40% меченого гормона.

Меченый паратгормон получают йодированием высокоочищенного гормона хлораминовым методом по Гринвуду и Хантеру. К раствору (1,5 мкг гормона в 25 мкл 0,4 моль фосфатного буфера pH 7,5) прибавляют 1 мКи $Na^{125}I$ высокой удельной активности, затем добавляют 20 мкг хлорамина Т в 20 мкл 0,04 моль фосфатного буферного раствора pH 7,5. Смесь интенсивно встряхивают, следя, чтобы не разбрызгивались реагенты, и точно через 15 с прибавляют 50 мкг метабисульфита Na в 50 мкл фосфатного буфера. Смесь сразу же разводят 1 мл буферного раствора, содержащего 2 мкг/мл альбумина, перемешивают и наносят на колонку (0,9×20 см) с биогелем Р-10, суспендированным в 0,1 моль/л уксусной кислоте. Колонку предварительно насыщают 2 мл 2%-ного раствора БСА в 0,1 моль/л уксусной кислоте. Меченый гормон элюируют 0,1 моль/л уксусной кислотой в пробирки, содержащие 0,05 мл 2%-ного раствора БСА в 0,1 моль/л уксусной кислоте. Для анализа аликвоты объединенных фракций разводят 0,08 моль вероналовым буфером pH 8,6, содержащим 2% сывороточного альбумина и 500 ед. контрикала или трасилола в 1 мл.

В качестве стандартов используют высокоочищенный паратгормон бычий, который растворяют в 0,1 моль/л уксусной кислоте, содержащей 0,5% сывороточного альбумина, до концентрации 10 мкг/мл. Для построения калибровочной кривой исходный раствор этого гормона разводят плазмой крови крупного рогатого скота, из которой адсорбирован присутствующий там паратгормон. Удаляют паратгормон порошком силикагеля Quso G=32 (США). Стандартный гормон разводят до концентрации 0,15—50 нг/мл.

Стандартный раствор паратгормона вносят по 100 мкл в пробирки в количестве 15, 50, 150, 500, 1500, 5000 пг.

В тест-пробирки вливают по 100 мкл исследуемой плазмы животных. Затем во все пробирки добавляют по 100 мкл ^{125}I-паратгормона и по 100 мкл рабочего разведения антисыворотки. Пробы инкубируют в течение 4 дней при 4°С, затем прибавляют по 100 мкл преципитирующей антисыворотки и пробы инкубируют еще 2 дня при 4°С. После центрифугирования (2000 об/мин, 20 мин при 4°С) надосадки декантируют, а радиоактивность измеряют на сцинтилляционном гамма-счетчике в осадках. Стандартную кривую строят по любому из вышеуказанных способов и по ней определяют содержание паратгормона в образцах.

Чувствительность данного метода в пределах 15—20 пг в пробе.

Учитывая, что коммерческие наборы для определения паратгормона у человека не обеспечивают стабильных и воспроизводимых результатов, а также имеют определенную видоспецифичность, для получения полезной диагностической информации у животных желательно пользоваться вышеописанным методом.

Клиническое значение. Содержание паратгормона определяют при патологической беременности, расстройстве функции печени, при гипофункции околощитовидных желез и фиброзной остеодистрофии. Параллельно целесообразно исследовать содержание фосфора и кальция в сыворотке крови.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНСУЛИНА

Инсулин образуется в β-клетках поджелудочной железы из предшественника — проинсулина. Состоит он из двух полипептидных цепей «а» и «в», соединенных двумя дисульфидными связями. Молекулярная масса инсулина приблизительно равна 6000. В организме инсулин является единственным гормоном,

который понижает уровень сахара в крови, поэтому его роль в регуляции углеводного обмена особенно велика. Секреция инсулина регулируется концентрацией глюкозы в циркулирующей крови поджелудочной железы. При увеличении концентрации глюкозы здоровая поджелудочная железа выделяет инсулин в течение 3—5 мин и дополнительно увеличивает базальный уровень путем усиления синтеза и секреции гормона. Независимо от этого гормоны-антагонисты влияют на концентрацию глюкозы в крови (глюкагон, гормон роста, кортизол и др.). Кроме этого, инсулин влияет на транспорт ионов калия и аминокислот через мембраны, а также воздействует через белковый и жировой обмен на общий метаболизм.

При недостатке инсулина наступает сахарный диабет с типичными последующими его осложнениями. При избытке инсулина развивается стойкая гипогликемия, что проявляется обычно при опухолях поджелудочной железы.

Для диагностики диабета определять инсулин нет необходимости, поскольку для этого вполне пригодна проба на сахар в крови и в моче. Но изучение уровня инсулина в крови может дать важные сведения о продуктивности животных, так как этот гормон влияет на общий метаболизм в организме.

Принцип определения инсулина радиоиммунологическим методом общий. Практически этот метод Р. Яллоу и С. Берсоном был разработан впервые именно для определения инсулина. Сейчас же его проводят лишь с небольшими изменениями, в частности, в способе метки инсулина и при разделении свободного и связанного лиганда.

Постановка метода. Антисыворотку к инсулину получают иммунизацией морских свинок непосредственно самим гормоном, без его конъюгирования с сывороточным альбумином. Для этого им подкожно вводят по 10—15 МЕ инсулина, эмульгированного с полным адъювантом Фрейнда. Последующие иммунизации проводят с неполным адъювантом. Иммунизацию повторяют 6—8 раз с 2-недельным интервалом. Через 10 дней после введения разрешающей дозы у свинок из сердца берут кровь, получают антисыворотку, титруют ее радиоиммунологически и выбирают ту, которая дает максимальный титр. Обычно разведения получают не менее 1 : 10 000.

При использовании метода двойных антител для разделения связанного и свободного лиганда используют продажную антисыворотку против иммуноглобулинов морской свинки (в разведении 1 : 3 или 1 : 10). При необходимости эту антисыворотку получают 4—5-кратной иммунизацией кроликов иммуноглобулином С морской свинки в полном адъюванте Фрейнда.

Стандартный препарат инсулина метят ^{125}I хлораминовым методом. Для этого к 5 мкг инсулина, растворенного в 25 мкл 0,5 моль фосфатного буфера (pH 7,5), прибавляют 2 мКи Na ^{125}I (удельная активность 50—100 мКи/мл) в объеме 50 мкл, затем 80—100 мкг хлорамина Т в 25—50 мкл фосфатного буфера 0,05 моль (pH 7,5). Смесь энергично встряхивают в течение 1 мин, а затем останавливают реакцию прибавлением 500 мкг метабисульфита Na (K) в 100 мкл фосфатного буфера и 2 мг йодида калия в 200 мкл того же буфера. ^{125}I-инсулин очищают гельфильтрацией на сефадексе G=50 (колонка 1×10 см) или на G=25 (колонка 1×12 см), предварительно уравновешенной 20 мг БСА в 20 мл 0,05 моль фосфатного буфера (pH 7,5). Гормон элюируют этим же буфером, собирая фракции по 0,5 мл. Меченый инсулин выходит в первом пике радиоактивности. Три фракции первого пика радиоактивности объединяют, разводят 0,05 моль фосфатным буфером (pH=7,5), содержащим 1% сывороточного альбумина, до активности 100 000 имп/мин в 10 мкл, разливают в аликвотах и хранят при —20°С. Для анализа разводят метку до 10 000 имп/мин в 100 мкл.

В качестве стандарта используют кристаллический препарат инсулина крупного рогатого скота или свиной с биологической активностью около 25 МЕ/мг.

Инсулин растворяют в 0,08 н. HCl до концентрации 50 МЕ/мл и используют для построения калибровочной кривой в концентрации от 10 до 200 мкМЕ/мл (предварительно разбавив рабочим буфером, pH 7,5).

Для определения инсулина в тест-пробирки последовательно вносят по 0,5 мл фосфатного буфера (0,05 моль, pH 7,5) для инкубации (в его состав, кроме 1% сывороточного альбумина, входит 0,01% мертиолата). В пробы, предназначенные для построения калибровочной кривой, вливают по 50 мкл стандарт-

ного гормона в разведении от 10 до 200 мкМЕ/мл, в остальные пробирки вносят по 50 мкл исследуемой сыворотки (плазмы) животных. Кроме того, в несколько пробирок вместо стандарта и определяемой плазмы добавляют по 50 мкл буфера — нулевая проба. Затем во все пробирки вносят по 100 мкл меченого инсулина в разведении 10 000 имп/мин на 100 мкл и по 100 мкл антисыворотки в рабочем разведении. Все пробы готовят в дубликатах. Пробы хорошо перемешивают, инкубируют 3 сут при 4°С. После этого во все пробы прибавляют по 100 мкл антисыворотки против иммуноглобулинов морской свинки в рабочем разведении и 100 мкл нормальной сыворотки морских свинок, перемешивают и инкубируют 16 ч при 4°С. Надосадки декантируют, а в осадках определяют радиоактивность на сцинтилляционном гамма-счетчике. Калибровочную кривую строят по отношению $B/B_0 \cdot 100\%$, где В — радиоактивность стандарта, B_0 — радиоактивность нулевой пробы. Найдя отношение B_x/B_0, по калибровочной кривой определяют концентрацию инсулина, где B_x — радиоактивность определяемой пробы.

Чувствительность метода — 0,5—1 мкМЕ инсулина в пробе. Метод специфичен для инсулина и хорошо воспроизводим.

Хорошо воспроизводимые результаты дает также способ разделения свободного и связанного антителами инсулина с помощью активированного угля, обработанного декстраном. По времени определения этот метод быстрее, чем с помощью вторых антител, но более трудоемок и требует дополнительных специальных условий.

Весьма перспективным является способ разделения свободного и связанного инсулина с помощью антител, фиксированных на стенках пробирки. Для этого в полистироловые или полипропиленовые пробирки (1×6 см) наливают по 1 мл разведенной антисыворотки против инсулина, инкубируют 3 ч при 37°С. В течение этого времени антитела фиксируются на стенках пробирок; содержимое пробирок сливают и их промывают физраствором, а затем 18 ч выдерживают в 0,05 моль фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 0,15 моль/л NaCl, 0,05% азида натрия и 0,05% твина-20. Подготовленные пробирки в этом буфере можно хранить в течение недели при комнатной температуре. Пробирки с лиофилизированным содержимым (1,5 мл буфера и антисыворотка) при комнатной температуре пригодны для использования в течение полугода.

В данном случае анализ намного ускоряется. После добавления стандартов или образца, буфера, меченого инсулина пробы инкубируют 16—18 ч при комнатной температуре, содержимое сливают, а пробирки ополаскивают дважды дистиллированной водой и считают радиоактивность осадков. При этом способе разделения свободного и связанного лиганда исключается стадия центрифугирования.

Чувствительность метода — 0,3—0,5 мкМЕ/100 мл (в пробе) или 55 мкМЕ инсулина в 1 мл плазмы. Наборы для радиоиммунологического определения инсулина имеют один и тот же принцип и различаются лишь условиями выполнения анализа и способом разделения свободного и связанного лиганда. Отечественной промышленностью освоен выпуск набора «риа-ИНС-ПГ—^{125}I» для определения инсулина в сыворотке крови человека. Имеющаяся в нем антисыворотка дает 100%-ную перекрестную реакцию с инсулином крупного рогатого скота и свиней. Это позволяет использовать данный набор для определения инсулина у сельскохозяйственных животных.

Для разделения связанного с антителами инсулина от свободного используют полиэтиленгликоль, который содержится в наборе в готовом для работы виде. Время инкубации для максимального связывания метки в этом случае не превышает 4 ч. В результате весь анализ — 100 или 200 проб — укладывается в один рабочий день.

Клиническое значение определения инсулина в крови животных связано с исследованием внутрисекреторной деятельности поджелудочной железы, которая выполняет большую и многогранную роль в углеводном, а также белковом и жировом обменах. В этой связи РИА инсулина будет особенно полезным при комплексной диспансеризации животных при различных типах кормления.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОРТИЗОЛА

Кортизол относится к глюкокортикостероидам. В эту же группу входят также кортизон и кортикостерон. Строение молекул этих соединений характеризуется наличием атома кислорода, связанного с 11-м углеродным атомом. Поэтому данную группу гормонов еще называют 11-оксикортикостероиды.

В коре надпочечников обезьян, овец, коз, морских свинок вырабатывается главным образом кортизол (гидрокортизон), у крыс, мышей, кроликов и птиц — кортикостерон, а у крупного рогатого скота, свиней и собак оба эти гормона образуются в значительных количествах. Кортизон обнаружен у рыб и рептилий. У млекопитающих он образуется из гидрокортизона вне надпочечников.

В крови кортизол связывается с транспортным белком транскортином и с сывороточным альбумином. Кортикостерон с транскортином почти не соединяется. Кортизол, связанный с транскортином, физиологически неактивен. Свою биологическую активность он проявляет только в тканях. В печени кортизол превращается в тетрагидрокортизон и другие 17-кетостероиды, которые соединяются с серной, фосфорной и глюкуроновой кислотами и быстро выводятся из организма с мочой. Кортикостерон превращается в печени в кортизон, прегнандион и прегнатриол.

Регуляция функции коры надпочечников осуществляется передней долей гипофиза посредством адренокортикотропного гормона. Однако секреция альдостерона не контролируется гипофизом. Есть данные о том, что секреция альдостерона регулируется гормоном эпифиза, хотя и не полностью.

Поскольку кортизол является относительно простым соединением, то в настоящее время он синтезирован искусственно уже многими фирмами, причем в радиохимическом центре «Амершам» (Англия) производят уже готовый меченый препарат, что несколько упрощает постановку радиоиммунологического анализа, так как в этом случае можно получить уже меченый кортизол.

Радиоиммунологическое определение кортизола. Суть способа йодирования кортизола по Болтону и Хантеру аналогична вышеописанному опосредованному введению внешней метки в белки, только вместо раствора белка используют стероидный гормон. Очистку меченого гормона от непрореагировавшего йода проводят на сефадексе G=25. Однако всегда нужно помнить, что введение опосредованной метки значительно изменяет молекулярную массу гормона и его пространственное строение, а из-за этого могут меняться и антигенные свойства. Поэтому каждую партию меченого гормона необходимо тщательно проверять.

Антитела к кортизолу получают иммунизацией кроликов или морских свинок конъюгатом — кортизол-сывороточным альбумином. Конъюгирование гормона с белком осуществляют с помощью О-(карбоксиметил)-оксима. Для этого 5 мг кортизол-карбоксиметилоксима растворяют в 1 мл диоксана, добавляют 10 мкл три-н-бутиламина, охлаждают раствор до 10°С, приливают туда 10 мкл изобутилхлорформиата и перемешивают в течение 30 мин на холоду. Растворяют 10 мг кристаллического БСА в 1 мл дистиллированной воды, pH которой предварительно доводят с помощью 2 моль/л NaOH до 9. Сливают оба этих раствора и перемешивают в течение 24 ч при 4°С. Затем данную смесь диализуют 36 ч против дистиллированной воды и содержимое диализных мешков лиофилизируют.

Кроликов иммунизируют конъюгатом кортизол-БСА, эмульгированного с полным адъювантом Фрейнда в расчете 100—500 мкг конъюгата на одно животное, или 15—30 мкг/кг. Вначале 5 раз животных иммунизируют еженедельно, а затем один раз в месяц подкожно $^1/_5$ часть и внутрикожно $^4/_5$ части эмульсии конъюгата в различных участках тела. Через 10—12 дней после каждой ежемесячной иммунизации у животных берут кровь и проверяют титр антител. Обычно он равен 1 : 100—1 : 100 000. При определении титра антител пробы инкубируют 16 ч при 4°С, в качестве лиганда используют меченый кортизол в количестве (0,025—0,1 нг). Разделение связанной и свободной фазы лиганда производят с помощью 0,2 мл суспензии активированного угля при инкубации от 20 до 30 мин с последующим центрифугированием (10 мин) при 2000 g. Если лиганд мечен тритием или ^{14}С-углеродом, то надосадочную жидкость декантиру-

ют в счетные сосуды, прибавляют туда по 10 мл сцинтилляционной жидкости и просчитывают на сцинтилляционном β-спектрометре. Если использовали кортизол меченый ^{125}I, то радиоактивность можно определить в осадках на гамма-счетчике. Используемая суспензия угля имеет следующий состав: 0,625 г активированного угля, 0,0625 г декстрана Т-70, 100 мл фосфатного буферного раствора, 0,1 моль pH 7, с добавлением 0,9% NaCl.

Антисыворотку с максимальным титром к кортизолу разводят до концентрации, способной связать 40—70% меченого ^{125}I-кортизола, и сразу же используют. Для длительного хранения сыворотку содержат неразведенной при —20°С.

Меченый гормон разводят до активности 10 тыс. имп/мин в 100 мкл. В качестве стандартов используют синтетический препарат кортизола, который растворяют в этаноле. Калибровочную кривую строят по серии разведений стандартов в 0,1 моль фосфатном буфере, pH 7 с добавлением 0,9% NaCl. Для этого готовят исходный раствор кортизола с концентрацией 2000 пг/мл (раствор А) и далее:

раствор Б — к 5 мл раствора А+5 мл рабочего буфера (в 0,5 мл — 500 пг);
раствор В — к 5 мл раствора Б+5 мл рабочего буфера (в 0,5 мл — 250 пг),
раствор Г — к 4 мл раствора В+6 мл рабочего буфера (0,5 мл — 100 пг),
раствор Д — к 5 мл раствора Г+5 мл рабочего буфера (0,5 мл — 50 пг),
раствор Е — к 5 мл раствора Д+5 мл рабочего буфера (0,5 мл — 25 пг);
раствор Ж — к 4 мл раствора Е+6 мл рабочего буфера (0,5 мл — 10 пг),
раствор З — к 5 мл раствора Ж+5 мл рабочего буфера (0,5 мл—5 пг),
раствор И — к 5 мл раствора З+5 мл рабочего буфера (0,5 мл — 2,5 пг).

Эти растворы пригодны для использования в течение 4 нед при хранении их в холодильнике (4°CN) и добавлении 0,1% азида натрия. Образцы замороженной сыворотки и плазмы, предназначенные для определения в них гормонов, можно хранить при —20°С в течение 2-х лет.

Образцы исследуемой сыворотки предварительно депротеинизируют с целью отделения кортизола от транскортина. Для этого 100 мкл сыворотки или плазмы крови отбирают в стеклянные пробирки и добавляют туда по 400 мкл 96% этанола. Содержимое пробирок перемешивают и центрифугируют 20 мин при 500 g. Для исследования отбирают по 100 мкл супернатанта.

В тест-пробирки приливают по 100 мкл стандартов либо депротеинизированного экстракта исследуемой сыворотки, затем по 100 мкл меченого гормона, растворенного в 0,1 моль фосфатном буфере (pH 7), и 300 мкл буферного раствора. Затем прибавляют 100 мкл специфической антисыворотки в рабочем титре. Пробирки тщательно перемешивают и инкубируют 16 ч при 4°С.

Разделение свободной и связанной фазы осуществляют с помощью активированного угля, обработанного декстраном Т-70 в вышеуказанной концентрации угля и декстрана. Добавление адсорбента необходимо проводить на холоду (4°С) и точно через 20 мин отцентрифугировать пробирки при 3000 об/мин 10 мин. Надосадки декантируют, а радиоактивность измеряют в осадках на гамма-счетчике (если в качестве метки используется ^{125}I). Калибровочная кривая в этом случае будет иметь обратную зависимость, поскольку в осадках определяют активность непрореагировавшего ^{125}I-кортизола.

Если в качестве меченого лиганда использовали ^{3}H или ^{14}C-кортизол, то радиоактивность исследуют в надосадочной жидкости. Надосадок декантируют в счетные сосуды, прибавляют туда по 10 мл сцинтилляционной жидкости и просчитывают на β-спектрометре.

В качестве сцинтиллятора можно использовать жидкость Брея: растворитель—диоксан 0,8 л; метанол 0,1 л; этиленгликоль 0,2 л; основной сцинтиллятор-ППО 4 г; смеситель спектра-ПОПОП 0,2 г; антитушитель—нафталин 60 г. Калибровочная кривая будет иметь в этом случае обычный вид.

В последнее время с успехом используют фиксированные на стенках полипропиленовых или полистироловых пробирок антитела. При этом нет необходимости в разделении свободной и связанной фазы гормона, ибо связавшийся с антителами кортизол остается на стенках пробирок. Радиоактивность осадка будет отражать количество связанного гормона.

По калибровочной кривой, построенной в координатах $B/B_0$100 % — концентрация гормона, находят уровень кортизола в неизвестных образцах по отношению B_x/B_0, где B_0 — активность пробы, в которую приливают 100 мкл сыворот-

ви, не содержащей кортизола; B_x — активность определяемого образца; B — активность пробы стандарта.

С успехом можно применять в качестве меченого лиганда кортизол — ^{14}C или ^{3}H-кортизол (внутренняя метка), выпускаемый радиохимическим центром «Амермаш» в Англии. В данном случае нет необходимости метить самому кортизол. Достоинством этого метода является также возможность длительного хранения меченого лиганда (при использовании ^{125}I-кортизола меченый гормон можно хранить не более 2 мес). Использование внутренней метки исключает также всякие различия в сродстве к антителам меченого и немеченого гормонов. Однако к недостаткам этого метода относится то, что измерение радиоактивности образцов проводят в жидкостном сцинтилляционном β-спектрометре, который в качестве дополнительной операции требует подготовки и разливания сцинтиллятора.

Методы определения 11-окси-кортикостероидов аналогичны описанному для радиоиммунологического определения кортизола. Вся трудность заключается лишь в получении специфических антител к конъюгату каждого из этих гормонов с сывороточным альбумином.

Определение уровня кортизола в крови животных имеет важное клиническое значение при выяснении патогенеза таких изменений в организме, как анемия, ослабление сердечной деятельности, желудочно-кишечные расстройства, атрофия мышц и др., развитие которых может происходить при недостаточной функции коры надпочечников, а также при исследовании нарушений водно-солевого, белкового и углеводного обмена при диспансеризации животных.

Базовый уровень кортизола подвержен большим колебаниям в зависимости от физиологического состояния.

Уровень кортизола (нг/мл) у коров черно-пестрой породы за 31—60 дней до отела находится в пределах 56,6±8,8, за 21—30 дней до отела — 70±5,1, за 1—10 дней до отела — 80,9±12, в день отела — 120,3±12, через 1—10 дней после отела — 35,1±4,4, через 11—30 дней — 43,2±2,3.

Концентрация кортизола в крови свиней колеблется от 15 до 86 нг/мл, общих 11-окс — от 6 до 17 мкг%, свободных 11-окс — от 2 до 10 мкг%, АКТГ — от 65 до 660 нг/мл.

РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕСТОСТЕРОНА

Тестостерон вырабатывается в семенниках (у млекопитающих интерстициальными клетками Лейдига). Биосинтез и секреция тестостерона находятся под контролем лютеинизирующего гормона — аденогипофиза (гормона, стимулирующего интерстициальные клетки). Секреция тестостерона составляет от 0,3 до 7 мг в сутки. В крови тестостерон находится в связанной с белками форме — с тестостероносвязывающим глобулином. Поэтому при его определении необходимо проводить экстракции сыворотки или плазмы органическими растворителями, такими как эфир или спирт. Биологическую активность в органах-мишенях тестостерон проявляет только в свободной от белка форме. В процессе катаболизма тестостерон превращается в менее активный андростерон и некоторые другие андрогены, соединяется в печени с глюкуроновой кислотой и выводится с мочой из организма. Тестостерон у самцов регулирует рост и развитие полового аппарата, вторичных половых признаков и появление половых рефлексов.

Учитывая, что у стероидных гормонов полностью отсутствует видовая специфичность, стероидные гормоны у любого вида сельскохозяйственных животных можно определить с использованием наборов.

Определение тестостерона с помощью наборов. В настоящее время наборы для определения тестостерона выпускают более чем 25 фирм. Часть из них поступает с внутренней меткой ^{3}H, но в большинстве используют тестостерон, меченный ^{125}I.

Рассмотрим определение тестостерона с помощью набора фирмы «Byh Mallinchrodt» (ФРГ). В состав набора входят: 1) 1 мл раствора ^{125}I-тестостерона в 95%-ном этаноле, активность порядка 2 мкКи (74 кБк); 2) сосуда по 30 мл

барбитал-ацетатного буфера в концентрации 0,2 моль/л, pH 7,4; 3) 0,5 мл тестостерона-стандарта, содержащего 32 мкг тестостерона в 95%-ном этаноле, что соответствует 1,12 нмоль/л тестостерона; 4) кроличья антисыворотка против тестостерона в титре 1 : 1000, лиофилизированная, растворяют в 1 мл дистиллированной воды; 5) 2 сосуда по 30 мл 95%-ного этанола. К этому набору относят также 50 ионообменных пластин в 0,15 моль/л растворе NaCl, 50 инкубационных пробирок, 6 сосудиков для разведения стандарта, 6,6 мг бычьего сывороточного альбумина лиофилизированного. Для проведения работы требуются еще автоматические микропипетки, мерные пипетки на 2 и 5 мл, мерный цилиндр на 200 мл, пастеровские пипетки, магнитная мешалка, баня на 37°С, центрифуга на 2000 q, ротатор, диэтиловый эфир для эфирной экстракции тестостерона и гамма-сцинтилляционный счетчик.

Растворять содержимое сосудов нужно только перед использованием. Экстрагировать тестостерон можно как с помощью эфира, так и с помощью этанола.

Экстракцию сыворотки проводят следующим образом.

1. К 2 мл эфира прибавляют 0,1 мл сыворотки, встряхивают 10—20 с на вибрационном смесителе, центрифугируют и переносят супернатант количественно в инкубационные пробирки (сосуды) с помощью пастеровской пипетки. Эту стадию можно заменить замораживанием сыворотки с эфиром. При этом водная фаза замерзает, а надосадок переносят количественно в инкубационные сосуды, в которых экстракт упаривают досуха.

2. Разводят 20 мл этанола в 5 мл дистиллированной воды, получают 75%-ный раствор этанола.

3. В данном наборе буфер поставляется в виде сухого порошка, который растворяют в дистиллированной воде до конечного объема — 200 мл.

4. 50 мкл стандарта тестостерона растворяют в 5 мл 75%-ного этанола. 0,25 мл полученного раствора смешивают с 4,75 мл буфера, осторожно перемешивают и используют как исходный для построения калибровочной кривой. Путем двукратных разбавлений исходного раствора тестостерона (с=1600 нг/мл) получают концентрации 800, 400, 200, 100 и 0 нг/100 мл. Затем по 100 мкл каждого стандарта прибавляют в инкубационные сосуды.

5. Растворяют антисыворотку в 1 мл дистиллированной воды, но так, чтобы не было вспенивания.

6. Осторожно растворяют бычий сывороточный альбумин в 1 мл дистиллированной воды.

7. Непосредственно перед использованием приготавливают реакционную смесь (155 мл буфера, 0,8 мл антисыворотки к тестостерону, 0,8 мл бычьего сывороточного альбумина) и осторожно перемешивают на магнитной мешалке.

8. Добавляют к каждому стандарту по 3 мл реакционной смеси, а также в сосуды с сухим сывороточным экстрактом неизвестного образца.

9. В течение 30 мин содержимое сосудов перемешивают при комнатной температуре (Vortex).

10. В сосуд с меткой приливают 2 мл буферного раствора и хорошо перемешивают.

11. Во все инкубационные сосуды прибавляют по 50 мкл разведенного буфером ^{125}I-тестостерона и инкубируют 30 мин при комнатной температуре.

12. В каждый инкубационный сосуд помещают ионообменные пластинки и затем перемешивают 45 мин на ротаторе.

13. Удаляют пинцетом ионообменные пластинки, следя за тем, чтобы на них не остались капли раствора.

14. Просчитывают радиоактивность в инкубационных сосудах.

Калибровочную кривую строят в координатах B/B_0 — концентрация стандарта, где B — остаточная радиоактивность стандарта пробы, B_0 — остаточная радиоактивность нулевого стандарта.

Принцип определения тестостерона этим набором с использованием для экстракции этанола аналогичен экстракции с помощью эфира, разница лишь в количествах реагентов.

Нормативных показателей уровня тестостерона в крови животных на данном РИА пока нет. Из литературных источников видно, что они имеют колебания в широких пределах, например у бычков от 0,1 до 16,8 нг/мл. Коэффициент

индивидуальной изменчивости варьирует в пределах 46,7—67,3%. Вместе с тем радиоиммунологическое тестирование этого гормона в комплексе с другими исследованиями окажется полезным в ведении контроля за состоянием самцов-производителей.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГОРМОНОВ ГИПОФИЗА

Регуляция организма и интеграция всех его органов и тканей в целостную систему обеспечиваются нервными и эндокринными факторами. Обе регулирующие системы объединяются гипоталамусом, нейросекреторные клетки которого занимают промежуточное положение между нервными и эндокринными. Таким образом, в нейроэндокринной системе гипоталамус занимает главное место. Влияние гипоталамуса на эндокринные функции во многих случаях осуществляется через гипофиз, который находится в функциональном единстве с гипоталамусом.

Задняя доля гипофиза секретирует вазопрессин и окситоцин, вырабатывающиеся в ядрах гипоталамуса. Промежуточная доля гипофиза вырабатывает и секретирует меланоцитостимулирующий гормон, который называют также меланоформным гормоном или интермедином. Окситоцин оказывает выраженное действие на матку и молокоотдачу и весьма слабо влияет на артериальное давление. Вазопрессин, наоборот, обладает высоким прессорным и антидиуретическим действием, но сравнительно слабо влияет на матку и молокоотдачу.

Передняя доля гипофиза продуцирует по крайней мере 6 гормонов, которые выделены в чистом виде. Их подразделяют на гликопротеиды — фолликулостимулирующий (ФСГ), лютеинизирующий (ЛГ) и тиреотропный (ТТГ) гормоны и простые белки (полипептиды) — соматотропный (СТГ), лактотропный и адренокортикотропный (АКТГ) гормоны.

Тиреотропный гормон регулирует функцию щитовидной железы, ФСГ и ЛГ влияют на половые железы. Активирование коры надпочечников осуществляется АКТГ. СТГ стимулирует рост тела за счет ускорения деления клеток и увеличения синтеза белка. Пролактин воздействует на молочную железу.

Кроме биологического метода определения гормонов гипофиза, в настоящее время разработаны радиоиммунологические, иммунорадиометрические и радиорецепторные. Наиболее полно условиям массового анализа отвечают методы радиоиммунологического определения гормонов гипофиза.

РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОКСИТОЦИНА

Окситоцин является октапептидом с молекулярной массой, равной 1050, и изоэлектрической точкой 7,7. Окситоцин аналогично вазопрессину не обладает видовой специфичностью, поэтому метод радиоиммунологического определения, разработанный для одного вида животного или человека, с успехом применяется для определения этого гормона у другого вида животных.

Для радиоиммунологического определения этого гормона необходима предварительная его экстракция из плазмы крови фуллеровой землей.

Антисыворотку к окситоцину получают иммунизацией кроликов конъюгатом окситоцина с сывороточным альбумином. Для получения конъюгата берут 40 мг синтетического окситоцина, 100 мл сывороточного альбумина и растворяют в 20 мл 0,1 моль фосфатного буфера, pH 7. К раствору при постоянном помешивании медленно прибавляют 10 мл 0,02 моль/л раствора глютаральдегида. Перемешивание продолжают в течение ночи при 4°С. Затем смесь диализуют против дистиллированной воды, разливают на аликвоты и замораживают. Для иммунизации эмульгируют конъюгат с полным адъювантом Фрейнда 1 : 1. Иммунизируют кроликов внутрикожным введением в различные участки спины 1 мл эмульсии, затем по 0,2 мл в течение 3 мес с интервалом в 2 нед, а потом раз в месяц в течение 5 мес. Наивысший титр антител к окситоцину получают на 8-м месяце от начала иммунизации. Антисыворотку разливают порциями и хранят при —20°С. Перед анализом разводят в 0,05 моль трис-HCl буфере, pH 8, содержащем 1% БСА, до концентрации, способной связать 40—60% радиоак-

тивности меченого ^{125}I-окситоцина, разведенного буфером до концентрации, содержащей 10 000 имп/мин в 100 мкл раствора.

Йодирование окситоцина осуществляется лактопероксидазным способом 1 мкг синтетического окситоцина в 10 мкл натрий-ацетатного буфера, pH 5,6 и 0,5 мКи ^{125}I смешивают с 40 мкл 0,4 моль натрий-ацетатного буфера, pH 6,5. Прибавляют свежую лактопероксидазу 0,6 мкг в 30 мкл и 20 мкл разведенной перекиси водорода (100 мкл 3%-ной перекиси водорода разбавляют перед использованием 200 мкл дистиллированной воды). Спустя 3 мин добавляют еще 10 мкл разбавленной перекиси водорода, слегка встряхивают и через 3 мин повторяют процедуру. Через 2 мин реакцию останавливают добавлением 1 мл 0,05 моль/трис-HCl буфера. Непрореагировавший йод удаляют адсорбцией на 1 г йодной смолы. Смесь центрифугируют, супернатант, содержащий ^{125}I-окситоцин, очищают на колонке 1×17 см с сефадексом G=25, уравновешенной трис-HCl буфером. Для анализа отбирают фракции с максимальной радиоактивностью (8—9 фракций). Перед использованием меченый окситоцин разводят трис-HCl буфером 0,05 моль, pH 8, содержащим 1% БСА, до активности 10 000 имп/мин в 100 мкл раствора.

Техника определения. К 0,5 мл гепаринизированной плазмы приливают 1 мл 1 моль HCl, высыпают туда 200 мг фуллеровой земли и встряхивают 10 мин. Смесь центрифугируют, осадок промывают последовательно 1,5 мл 1 моль HCl и 2 мл бидистиллированной воды. Окситоцин элюируют из фуллеровой земли встряхиванием с 1,5 мл 80%-ного водного ацетона. Элюирование повторяют дважды. Объединенные элюанты выпаривают досуха на водяной бане при 55°С. В каждом опыте к стандартной плазме добавляют меченый окситоцин и по уменьшению радиоактивности определяют потери в ходе экстракции, которые учитывают при окончательных расчетах. Сухой экстракт растворяют в 250 мкл трис-буфера и по 100 мкл раствора разливают в пробирки. Одновременно в пробирки добавляют разведенный в трис-HCl буфере стандартный окситоцин в количестве 5, 10, 100, 250 и 500 пг, затем 10 мкл антисыворотки в рабочем разведении (1 : 1200) и 10 мкл раствора меченого окситоцина в рабочем разведении (13,5 нг). Параллельно готовят нулевую пробу, не содержащую окситоцина, — контроль связывающей способности антисыворотки и пробу без антисыворотки — общая радиоактивность. В дубликате готовят также контрольную пробу. Вместо исследуемой плазмы или стандарта в нее вносят 0,1 мл экстракта плазмы крови беременного животного (то есть плазму с высокой окситоциназной активностью) для учета неспецифических факторов — в эти пробы антисыворотку не добавляют. Пробы инкубируют 18 ч при 4°С, прибавляют 10 мкл разведенной преципитирующей антисыворотки против иммуноглобулинов кролика (кроме пробы на общую радиоактивность) и инкубируют еще 1 ч при комнатной температуре. После этого прибавляют 100 мкл 4 моль раствора сульфата аммония. Измеряют общую радиоактивность каждой пробы. Затем их центрифугируют при 5000 g 10 мин. Супернатант удаляют и измеряют радиоактивность осадков. Стандартную кривую строят с учетом потерь при экстракции и радиоактивности контрольной пробы, а по отношению B/B_0 — концентрация стандарта строят калибровочную кривую.

Чувствительность метода составляет 2,5 пг окситоцина в пробе.

Учитывая большую роль окситоцина у самок в процессе оплодотворения, проявления схваток и изгнания плода во время родов, а также стимуляции молокоотдачи, определение данного гормона позволит в комплексе с другими исследованиями выяснить причины бесплодия и целенаправленно вести селекционно-племенную работу.

РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОРТИКОТРОПИНА (АКТГ) В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЖИВОТНЫХ

Молекулярный вес кортикотропина равен 4567 дальтон, изоэлектрическая точка равна 6,6. Для проявления биологической активности гормона важно наличие свободной α-аминогруппы на N-конце пептидной цепи. Отщепление значительных пептидных фрагментов от карбоксильного конца гормона, вплоть до 25-го остатка, не вызывает существенных изменений в его активности. Постепен-

ное падение активности гормона отмечают при укорочении пептидной цепи, начиная с 24-го остатка. Содержание АКТГ в крови животных находится под контролем гипоталамуса, который осуществляет регуляцию высвобождения кортикотропина из клеток аденогипофиза посредством АКТГ-рилизинг-гормона (кортиколиберина).

Основное действие АКТГ в организме опосредовано корой надпочечников. Стимулируя образование кортикостероидов, введение кортикотропина вызывает все те ответные реакции, которые характерны для кортикостероидов, — влияние на метаболизм углеводов, белков, липидов, на нервно-мышечную возбудимость, на воспалительные и аллергические процессы. При введении АКТГ у животных наблюдают лимфопению, эозинопению и усиление эритропоэза. Кроме того, АКТГ непосредственно сам влияет на ткани — это проявление меланоцитостимулирующей активности гормона, а также обусловлено активацией липазы в жировой ткани (липолитическое действие АКТГ).

Учитывая отсутствие видовой специфичности у АКТГ, определение его можно проводить в гетерологической системе одновременно у крупного рогатого скота, овец и свиней. Для установления данного гормона у сельскохозяйственных животных пригодны наборы, выпускаемые фирмой CJS—CEA—SORJN, предназначенные для определения кортикотропина у человека.

Радиоиммунологическое определение АКТГ в плазме крови животных с помощью наборов CEA—SORJN (Франция). В данном наборе для получения антител использован 1—24 фрагмент молекулы АКТГ, который является по аминокислотной последовательности одинаковым у крупного рогатого скота и человека. Это позволяет вести специфическое определение АКТГ у всех животных. Кроме того, при использовании данного набора исключается стадия экстракции АКТГ из образцов плазмы, что значительно упрощает и ускоряет работу с гормоном. Для установления АКТГ в одной пробе требуется 100 мкл исследуемой плазмы.

В состав набора входят меченый ^{125}I-АКТГ в лиофилизированной форме, лиофилизированный нулевой стандарт кортикотропина, лиофилизированные стандарты — 5 пузырьков (при растворении содержимого которых в 0,5 мл буфера получают содержание АКТГ, равное от 25 до 900 пг/мл), лиофилизированная сыворотка, меркаптоэтанол (используется как стабилизатор), активированный уголь и пакетик буфера в виде порошка. Набор выпускают на 100 и 200 определений (все компоненты — в двойном количестве). Нулевой стандарт разводят в 1 мл дистиллированной воды. Буфер растворяют в 200 мл дистиллированной воды, добавив туда содержимое пузырька с меркаптоэтанолом (рабочий буфер 0,02 моль/л, pH 8,4). Стандарты растворяют в 0,5 мл рабочего буфера, ^{125}I-АКТГ — в 10 мл рабочего буфера и антисыворотку — в 10 мл рабочего буфера. В активированный уголь (1 г) добавляют буфер — на один пузырек 50 мл рабочего буфера.

Все лиофилизированные компоненты набора растворяют только в день использования. В растворенном виде стабильность их сохраняется 3 дня при температуре 2—6°С. АКТГ определяют этим методом только в ЭДТА-плазме (1 мг/мл крови), образцы гепаринизированной плазмы непригодны. Если АКТГ выявляют в течение 24 ч после взятия крови, то плазму хранят при 2—6°С, если же в течение 2 мес, то при —20°С. Если же образцы хранят более 2 мес, то в них вводят ингибиторы протеиназ — контрикал или трасилол в количестве 100 ед/мл крови.

Выполнение анализа. Готовят серию пробирок в дубликатах: Т — общая активность, С — неспецифическое связывание для стандартов, 0 — нулевой стандарт, Si — группа стандартных пробирок для построения калибровочной кривой, Sx — группа пробирок с неизвестным образцом АКТГ, C_x — неспецифическое связывание для определяемых образцов плазмы.

В пробирки группы Т приливают 1,3 мл рабочего буфера и 0,1 мл меченого ^{125}I-АКТГ; в пробирки группы С — 0,8 мл буфера, 0,1 мл нулевого стандарта и 0,1 мл метки; в пробирки группы О—0,7 мл буфера, 0,1 мл нулевого стандарта, 0,1 мл метки и 0,1 мл антисыворотки; в пробирки Si (стандарта) — 0,7 мл буфера, 0,1 мл соответствующего стандарта, 0,1 мл метки и 0,1 мл антител; пробирки группы Sx готовят аналогично группе Si, только вместо стандартного раствора прибавляют 0,1 мл определяемой плазмы; пробирки

группы C_x готовят аналогично C, только вместо нулевого стандарта добавляют по 0,1 мл определяемой плазмы. Все реагенты приливают при комнатной температуре. Затем пробы инкубируют в течение 48 ч при 2—6°С. На 3-й день во все группы пробирок, за исключением группы Т, вносят по 0,5 мл тщательно перемешанной, охлажденной до 2—6°С суспензии активированного угля. Затем пробы центрифугируют 15 мин при 2000 g. Время с момента добавления активированного угля до центрифугирования не должно превышать 5 мин. После центрифугирования супернатант количественно декантируют и просчитывают в нем активность.

Калибровочную кривую строят в координатах B_1/B_0 — концентрация гормона (пг/мл). Количество неизвестного образца находят по калибровочной кривой, предварительно высчитав B_x/B_0. Для стандарта: $B/B_0 = \frac{Si - C}{O - C} \cdot 100\%$.

Для неизвестного образца:

$$B_x/B_0 = \frac{S_x - C_x/T - C}{O - C/T - C} \cdot 100\%,$$

где $B_0/T = \frac{O - C}{T - C} \cdot 100\%$ — связывающая способность антисыворотки.

Процент связанной метки для стандартов: $B/T = \frac{Si - C}{T - C} \cdot 100\%$.

Процент связанной метки для неизвестного образца равен:

$$B_x/T = \frac{S_x - C_x}{T - C_x} \cdot 100\%;$$

если C_x равно C, то формула для расчета B_x/B_0 упрощается:

$$B_x/B_0 = \frac{S_x - C \text{ (или } C_x)}{O - C \text{ (или } C_x)} \cdot 100\%.$$

В данных формулах T, C, Si, Sx, C_x представляют собой скорость счета в имп/мин. Процент связанной метки для стандартов и неизвестного образца никогда не должен превышать процент связанной метки для нулевого стандарта. Если же он равен нулевому стандарту, то значит, в образце отсутствует АКТГ.

Для упрощения расчетов, после того как найден процент связанной метки для нулевого стандарта и неизвестного образца, достаточно Bi/T% или B_x/T% разделить на найденное значение B_0/T% и получим искомое Bi/B_0% или B_x/B_0%.

Чувствительность данного метода анализа — 10±4 пг/мл.

У бычков черно-пестрой породы содержание АКТГ в плазме крови в зависимости от возраста находится в пределах 51—78 пг/мл.

Многогранное физиологическое действие кортикотропина в животном организме (влияет на функцию коры надпочечников, усиливает окислительное фосфорилирование, повышает скорость синтеза белков, активирует гликогенолиз и увеличивает образование кортикостероидов) указывает на необходимость определения уровня этого гормона при исследовании интимных сторон патогенеза нарушений обмена веществ и сопутствующих заболеваний у животных.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОЛЛИКУЛОСТИМУЛИРУЮЩЕГО ГОРМОНА (ФСГ)

Фолликулостимулирующий гормон представляет собой кислый гликопротеид, состоящий из α- и β-цепей. Молекулярная масса гормона 41 000, изоэлектрическая точка 4,5. Период полураспада его в крови составляет около 2 ч. Специфическое гормональное действие связано с β-цепью. Гормонально неактивная α-цепь агомологична лютеинизирующему гормону (ЛГ), а также тиреотропину и хорионическому гонадотропину. ФСГ стимулирует рост гранулезных клеток яичников и вместе с ЛГ способствует созреванию фолликулов яичников. У сам-

цов ФСГ способствует спермиогенезу. Уровень ФСГ подвержен изменению в сыворотке крови с частотой, равной 15 мин. Поэтому пробы для определения ФСГ всегда нужно брать в одно и то же время, а базальные величины получают на основании трех проб сыворотки, взятых с интервалом в 15 мин. В середине цикла наблюдается овуляторный подъем ФСГ, который часто совпадает с подъемом ЛГ. Регуляция синтеза и секреции ФСГ и ЛГ осуществляется гипоталамусом через посредство лютропин-рилизинг гормона.

ФСГ имеет выраженную видовую специфичность у человека и животных. Аналогичные антигенные свойства присущи ФСГ крупного рогатого скота и овец, а также человека и обезьяны. Для определения ФСГ у овец и крупного рогатого скота в качестве стандартов и меченого лиганда можно использовать бычий ФСГ. Антитела, полученные к бычьему ФСГ, пригодны для определения этого гормона у овец. ФСГ у свиней и птиц определяют с помощью свиного и птичьего очищенного фолликулостимулирующего гормона.

Принцип метода, получение антител и мечение гормона аналогичны для проведения радиоиммунологического анализа у всех видов животных. Различие заключается только в исходном материале для получения специфической антисыворотки и меченого ФСГ.

Антисыворотку против ФСГ получают иммунизацией кроликов или морских свинок очищенным препаратом ФСГ в количестве 1—5 мг на одну иммунизацию, эмульгированным с полным адъювантом Фрейнда. ФСГ разводят в 1 мл физраствора и смешивают в соотношении 1 : 1 с адъювантом. Иммунизируют животных внутрикожно или в подушечки лап в течение месяца еженедельно. Через месяц повторяют инъекцию, а через 2 нед у животных берут кровь. После отбора антисыворотки устанавливают ее титр и проводят ее истощение избытком хорионического гонадотропина для удаления антител против α-цепи ФСГ, гомологичной ЛГ, ТСГ и хорионическому гонадотропину. У истощенной антисыворотки определяют титр, при котором она должна связывать 30—50% меченого ФСГ в рабочем разведении. Разводят антисыворотку 0,05 моль натрий-фосфатным буферным раствором (pH 7,5), содержащим 10 г 0,5% БСА, 0,15 моль/л NaCl, 0,010 мертиолата и 0,01 моль ЭДТА (буфер А).

ФСГ метят по методу Гринвуда с помощью хлорамина Т и сразу же очищают на колонке (1×15 см) с сефадексом G=50 или G=75. Элюирование проводят фосфатным буфером, pH 7,5. Если меченый гормон хранят в холодильнике до использования более 1 нед, то требуется вторичная очистка гель-хроматографией на сефадексе. Хорошие результаты йодирования бычьего ФСГ получают с помощью лактопероксидазного метода. В качестве стандарта используют высокоочищенный ФСГ с известной удельной биологической активностью, который разводят 0,05 моль/л фосфатным буфером (pH 7,5), содержащим 0,5% БСА, 0,15 моль/л NaCl и 0,01% мертиолата. Стандартные растворы разводят до концентрации от 0,5 до 50 мМЕ/мл или в пределах 0,25—20 нг/мл.

Техника определения. В пробирки приливают по 50 мкл плазмы или сыворотки животных, 50 мкл антисыворотки в рабочем разведении, 50 мкл раствора меченого ФСГ и 50 мкл буферного раствора А. Стандарты готовят аналогичным образом, только в них добавляют еще по 50 мкл лошадиной сыворотки и соответственно объем буфера (50 мкл). Кроме того, готовят нулевые пробы, не содержащие фоллитропина, и пробы на общую радиоактивность. Все пробы делают в дубликатах.

Инкубируют реакционную смесь 4 сут при 4°С. По окончании инкубации к пробам добавляют по 100 мкл преципитирующей антисыворотки против иммуноглобулинов кролика в рабочем разведении (1 : 3) и 100 мкл нормальной кроличьей сыворотки, разведенной буфером А в соотношении 1 : 400. Инкубацию еще продолжают 36—48 ч при 4°С, а затем центрифугируют 20 мин при 4000—5000 об/мин, за исключением проб на общую радиоактивность. Надосадки декантируют, осадки дважды промывают фосфатным буфером, содержащим 25% БСА, для предотвращения адсорбции остатков свободного меченого фоллитропина на стенках пробирки.

Радиоактивность осадков измеряют на сцинцилляционном гамма-счетчике. Вычисляют процент связывания в опытных пробах по отношению к нулевой и по калибровочной кривой находят содержание гормонов в исследуемых образцах.

Чувствительность метода 0,025 мМЕ в пробе.

Метод обладает высокой специфичностью при условии полной адсорбции неспецифических антител к α-цепи молекулы ФСГ.

Концентрация ФСГ в сыворотке крови животных подвержена колебаниям как индивидуального характера, так и по периодам беременности и полового цикла. Максимальный уровень обнаруживается в период охоты и совпадает с пиком ЛГ. У коров он составляет 90—100 нг/мл, у свиней — 9—12 нг/мл. Базальный уровень у коров — 42—44 нг/мл, у свиней — 9—12 нг/мл. У овец при использовании гетерогенного РИА определения ФСГ максимум составил 200 нг/мл в день охоты, а базальный уровень — 100—160 нг/мл. Определение уровня ФСГ необходимо для оценки воспроизводительной функции животных.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА (ЛГ) РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

ЛГ, как и ФСГ, является гликопротеидом с молекулярной массой 30 000 дальтон и изоэлектрической точкой 4—4,5 у барана и 7,8 у крупного рогатого скота. Молекула лютропина состоит из α- и β-цепей с молекулярной массой по 15 тыс. дальтон. Биологический период полураспада в крови составляет приблизительно 20 мин. Специфическая биологическая активность связана с β-цепью. α-цепь ЛГ гомологична α-цепи ФСГ, тиреотропину и хорионическому гонадотропину. В изолированном виде β-цепь биологически почти неактивна и только интактная молекула способна проявлять свою специфическую активность.

Лютеинизирующий гормон стимулирует биосинтез прогестерона в желтом теле, а также образование тестостерона. ЛГ совместно с ФСГ участвует в овуляции, имплантации зиготы, формировании и созревании плода. Концентрация гормона сильно колеблется в течение суток, в связи с чем взятие крови на определение ЛГ необходимо проводить в одно и то же время. Базальные пробы определяют по среднему из трех определений ЛГ в крови, взятой с интервалом в 15 мин. Значительное увеличение концентрации ЛГ наблюдается в середине овуляторного цикла. Базальное значение восстанавливается через 2 сут. Изучение уровня ЛГ и ФСГ необходимо для оценки воспроизводительной функций животных. ЛГ обладает также видовыми различиями в антигенных свойствах, связанных с β-цепью, хотя и менее выраженными, чем у ФСГ. Хорошие результаты дают системы для определения ЛГ у овец и крупного рогатого скота, ибо ЛГ этих животных проявляет одинаковые антигенные свойства. Принцип определения ЛГ радиоиммунологическим методом общий для данного типа.

Получение антисыворотки. Антисыворотку к ЛГ получают иммунизацией кроликов очищенным гормоном в количестве до 1 мг, эмульгированным в полном адъюванте Фрейнда. Антиген вводят подкожно с 3-недельным интервалом в течение 3 мес. Перед анализом антисыворотку разводят 0,05 моль ЭДТА (pH 7) до концентрации, способной связать 50% меченого ЛГ. Каждую полученную антисыворотку проверяют на способность связывать ФСГ и другие гликопротеидные гормоны. При наличии перекрестной реакции, происходящей за счет гомологичной α-цепи, эти сыворотки необходимо истощать избытком данных гормонов и последующей инкубацией в течение суток при 4°С. Таким образом происходит насыщение общих детерминант немечеными лигандами (гормонами). Метят ЛГ аналогично ФСГ. Для разделения свободной и связанной фазы гормона пользуются методом двойных антител. Преципитирующую антисыворотку получают иммунизацией овец кроличьими иммуноглобулинами.

Техника определения. В тест-пробирки вносят по 200 мкл сыворотки, а в пробирки, предназначенные для построения калибровочной кривой, добавляют такие же объемы стандарта в рабочем разведении от 0,05—5 мМЕ или в количестве 0,03—50 нг в пробе. Во все пробирки приливают по 300 мкл 0,01 моль фосфатного буфера (pH 7,5), содержащего 0,14 моль/л NaCl и 1% БСА (буфер А). Одновременно готовят нулевые пробы и пробы на общую радиоактивность. К ЛГ прибавляют по 200 мкл антисыворотки в рабочем разведении, пробы встряхивают и инкубируют 24 ч при 4°С. Затем в пробирки вносят по 100 мкл раствора меченого гормона и продолжают инкубацию еще 24 ч при 4°С. После

этого прибавляют по 200 мкл преципитирующей антисыворотки против гамма-глобулинов кролика. Смесь инкубируют еще 3 дня при 4°С. По окончании инкубации в пробы прибавляют по 300 мкл буфера «А» и центрифугируют 30 мин при 1000 q и 4°С (исключая пробы на общую радиоактивность). Радиоактивность осадков измеряют на гамма-счетчике. Найдя отношение B_x/B_0 100% (где B_x — счет образца неизвестной концентрации, а B_0 — счет нулевой пробы), по калибровочной кривой находят концентрацию гормона.

В настоящее время 25 фирмами выпускаются наборы для определения лютеинизирующего гормона у человека. Однако для определения ЛГ у животных необходимо все-таки пользоваться гомологичной системой.

Концентрация ЛГ в сыворотке крови животных, так же как и ФСГ, подвержена значительным колебаниям как индивидуального характера, так и по периодам полового цикла и беременности. У коров в начале полового цикла уровень ЛГ находится в пределах 2 нг/мл. Предовуляторный пик достигает 12,9 нг/мл с колебаниями от 5 до 19,5 нг/мл. Выявлена прямая зависимость между оплодотворяемостью коров и уровнем ЛГ в их крови в предовуляторный период. У оплодотворившихся коров уровень ЛГ составляет 12 нг/мл против 2,6—3,2 нг/мл у неоплодотворившихся. Базальный уровень ЛГ в крови циклирующих овец составляет 1—2 нг/мл, у свиней — 1—1,5 нг/мл. Определение уровня ЛГ необходимо для оценки воспроизводительной функции животных.

РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОМАТОТРОПИНА (СТГ) В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Соматотропный гормон представляет собой полипептид с молекулярной массой 23—25 тыс. дальтон. В сыворотке крови имеются белковые фракции с различной молекулярной массой, но обладающие иммунореактивностью гормона. Соматотропный гормон обладает выраженной видовой специфичностью. СТГ овцы и человека отличаются расположением 70 аминокислотных остатков, что проявляется в их различной иммуногенности. Наиболее близкую структуру, а значит, и иммуногенные свойства имеет соматотропный гормон овцы и крупного рогатого скота. СТГ у этих животных отличается расположением лишь двух аминокислотных остатков.

Секреция соматотропина клетками аденогипофиза в кровь регулируется соматотропин-рилизинг-гормоном и соматотропин-ингибирующим гормоном, имеющими гипоталамическое происхождение.

СТГ имеет широкий спектр биологического действия в организме. Выражается это в увеличении размеров тела, стимуляции роста скелета, активации анаболических процессов, в частности биосинтеза белка, в жиромобилизации и других процессах. В отношении углеводного и жирового обменов СТГ играет роль антагониста инсулина.

Наборы, предназначенные для определения СТГ у человека, непригодны для определения этого гормона у сельскохозяйственных животных.

Антисыворотку к СТГ получают иммунизацией кроликов очищенным СТГ крупного рогатого скота, эмульгированным в полном адъюванте Фрейнда. Одновременно делают 30 внутрикожных инъекций СТГ вдоль правого и левого бока животных. Через 1,2—2 мес проверяют титр антител. В последующем проводят одноразовые подкожные инъекции СТГ с интервалом в 21 день (1 мг гормона в 0,5 мл физиологического раствора эмульгируют с 0,5 мл адъюванта). Через 9—14 дней после инъекций берут кровь и в полученной сыворотке определяют титр и гомологичность антител методом Аухтерлони и лиофилизируют ее. Для образования плотных осадков комплекса антиген — антитело лиофилизированную антисыворотку к соматотропину полимеризуют с помощью изобутилового эфира хлоругольной кислоты с последующей многократной отмывкой. Полученный таким образом иммуносорбент в концентрации 8 мг на 1 мл 0,05 моль фосфатного буфера (pH 7,5) хранят с мертиолатом при 4°С. Из сыворотки интактных кроликов аналогичным образом готовят нейтральный сорбент.

Йодируют СТГ хлораминовым методом по F. C. Greenwood et al. (1963 г.) или лактопероксидазным способом. Очистку меченого ^{125}I-СТГ проводят на ко-

лонке (1,2×28 см) с сефадексом G-25, уравновешенную 0,05 моль фосфатным буфером, содержащим 0,14 моль/л NaCl и 0,25% сывороточного альбумина человека. Фракции собирают по 1 мл и в аликвотах определяют радиоактивность на гамма-счетчике. Фракции, соответствующие ^{125}I-СТГ, разводят элюирующим буфером до активности 25 000 имп/мин в 100 мкл раствора, разливают на аликвоты и хранят замороженными.

Техника определения. В инкубационные пластиковые пробирки вносят последовательно 200 мкл иммуносорбента (полимеризованной антисыворотки к СТГ), 100 мкл исследуемой сыворотки крови (или стандартов СТГ), 100 мкл меченого ^{125}I-СТГ в рабочем разведении и 100 мкл фосфатного буфера (0,05 моль, pH 7,5). Инкубацию проводят при комнатной температуре (6—24 ч) и встряхивании. По окончании инкубации центрифугированием при 3000 q отделяют связанный сорбентом ^{125}I-СТГ от свободного, осадок однократно промывают 2 мл 0,05 моль натрий-фосфатного буфера (pH 7,5) с 0,1% TWEEN-20 и повторно центрифугируют. Надосадки декантируют, а в осадках определяют радиоактивность связанного с антителами ^{125}I-СТГ.

По калибровочной кривой, построенной в координатах: процент связанной метки — количество СТГ, находят концентрацию гормона в сыворотке животных.

Базальный уровень СТГ в крови у бычков от 1,5- до 13-месячного возраста составляет 7,2—10,5 нг/мл. У них обнаружена положительная корреляция между уровнем среднесуточного прироста массы и концентрацией СТГ в крови.

Исследование СТГ у животных может служить контролем выяснения причин отставания в росте, а также при использовании стимулирующих средств для откорма животных.

РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЛАКТИНА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Пролактин — один из наиболее филогенетически древних гормонов. Он обнаружен у всех классов позвоночных и оказывает многообразное действие на разные стороны обмена веществ. Молекула пролактина имеет одну полипептидную цепь с молекулярной массой от 20 тыс. до 25 тыс. дальтон. Пролактин обладает выраженной биологической специфичностью. Бычий или овечий пролактин не конкурирует с человечьим пролактином за связывание с антисывороткой к пролактину человека, и, наоборот, антисыворотка к бычьему гормону не связывает пролактин человека. Поэтому наборы, выпускаемые рядом фирм для определения пролактина человека, непригодны для определения этого гормона сельскохозяйственных животных. Однако пролактины овцы и крупного рогатого скота не обладают видовыми антигенными различиями и имеют сходное по аминокислотному составу строение, поэтому их можно заменять один другим (Биологическая активность очищенных овечьих препаратов пролактина — до 35 МЕ/мг, человека — до 40 МЕ/мг.)

Антисыворотку к овечьему или бычьему пролактину получают внутрикожной иммунизацией кроликов (делают 30—40 инъекций одному животному). Первую иммунизацию проводят с полным адъювантом Фрейнда, последующие — с неполным. На одного кролика при данном способе иммунизации (без конъюгирования с БСА) берут 10 мг гормона, растворяют его в 1 мл 0,15 моль/л NaCl (pH 7,4) и смешивают с равным объемом адьюванта. Эмульсию растворяют в фарфоровой ступке до полной гомогенности. Гормон вводят с недельным интервалом в течение месяца. Через 9—12 дней после последней иммунизации у животных берут кровь и получают антисыворотку. Для работы используют разведенную антисыворотку, способную связать 40—60% меченого пролактина в рабочем разведении.

Йодирование пролактина осуществляют по методу Гринвуда с некоторыми модификациями. 10 мкг гормона в 10 мкл 0,4 моль фосфатного буфера (pH 7,4) смешивают с 25 мкл Na^{125}I (1мКи/л) в 0,4 моль фосфатном буфере (pH 7,4). Затем добавляют 25 мкг хлорамина Т и в течение 30 с реакционную смесь энергично перемешивают. Реакцию останавливают добавлением 100 мкг метабисульфита натрия. В реакционную смесь после этого вносят 100 мкл 16%-ного раствора сахарозы. Общий объем смеси — 260 мкл, очистку меченого

пролактина проводят на колонке (1×25 см) с сефадексом G-25. Элюируют гормон 0,05 моль фосфатным буфером (pH 7,4), содержащим 1% сывороточного альбумина человека. Меченый гормон обычно содержится во фракциях первого пика.

Перед использованием ^{125}I-пролактин разводят до концентрации, обеспечивающей в 100 мкл раствора счет, равный 30 000 имп/мин.

Техника определения. В реакционные пробирки вносят 100 мкл определяемой плазмы крови или стандартный бычий гормон в разведении от 0,5 до 100 нг/мл, 100 мкл антисыворотки к бычьему пролактину, 100 мкл меченого ^{125}I-пролактина в рабочем разведении и 100 мкл 0,05 моль фосфатного буфера, pH 7,4. Одновременно готовят нулевую пробу, где вместо стандарта или испытуемой плазмы берут 100 мкл буфера. Пробы инкубируют 24 ч при комнатной температуре, а затем добавляют ослиную преципитирующую антисыворотку против глобулинов кролика в предварительно установленном разведении и продолжают инкубацию еще 24 ч.

Рабочим разведением преципитирующей антисыворотки считается такое, при котором происходит максимальное осаждение комплекса ^{125}I-Ar-Ат$_1$. Для того чтобы преципитат был виден и при центрифугировании образовывались плотные осадки, перед внесением преципитирующей антисыворотки в пробы добавляют по 100 мкл нормальной сыворотки кролика в разведении 1 : 100 или 1 : 200. Если эту сыворотку не вводят, то в инкубационную среду после первого центрифугирования вносят по 200 мкл 5%-ной суспензии синтетического поливинилацетатного клея и повторно центрифугируют 20 мин при 2000 q. Выпавший при этом осадок клея плотно прижимает ко дну пробирки преципитат.

Радиоактивность просчитывают в осадках. По калибровочной кривой, построенной в координатах $B/B_0 \cdot 100\%$ — концентрация стандартного гормона, находят уровень пролактина в неизвестных образцах по отношению $B_x/B_0 \cdot 100\%$ (B_0 — скорость счета «нулевой» пробы, B_x — скорость счета определяемой пробы). В качестве стандарта можно использовать отечественный препарат пролактина крупного рогатого скота.

Для определения пролактина в плазме крови свиней анализ выполняют в гетерологичной системе, состоящей из кроличьей антисыворотки к овечьему пролактину, стабильного и йодированного ^{125}I свиного гипофизарного пролактина. Для разделения связанного и свободного гормона используют метод двойных антител. Чувствительность определения — 80 пг в пробе. Высокая специфичность.

Ввиду почти полного совпадения антигенных свойств овечьего и птичьего пролактина определение пролактина в гипофизе и плазме крови птиц можно выполнять в гетерологичной системе, используя антитела, полученные к овечьему пролактину, а в качестве стандарта — овечий пролактин.

Определение уровня пролактина применяется в комплексе с определением концентрации других гормонов (гонадотропинов, прогестерона) для диагностики гормональных нарушений, связанных с выявлением причин бесплодия.

Содержание пролактина в плазме крови подвержено значительным колебаниям. Физиологическую гиперпролактинемию наблюдают при молокоотдаче, беременности. У лактирующих животных пролактин выделяется из аденогипофиза с определенной периодичностью и уровень его связан с интенсивностью синтетических процессов в молочной железе. Во время доения концентрация гормона в крови значительно возрастает и доходит в некоторых случаях до 200 нг/мл. Наибольшее количество пролактина наблюдается в первые 2 мин доения, а затем — до начала очередной дойки — уменьшается; особенно резкое снижение пролактина происходит в первый час после дойки.

Базальный уровень пролактина у свиней 10—15 нг/мл, а в период лактации — до 100 нг/мл.

Источники: 3, 15, 24, 34, 36, 97, 100—105, 107, 117, 121, 124, 129, 131, 133, 135, 139—156.

1. Некоторые единицы международной системы (СИ) и их обозначения

Производные единиц СИ образуются следующим образом:

а) умножением на фактор 10^3

Префикс	Символ	Множитель
экза	Э	10^{18}
пета	П	10^{15}
тера	Т	10^{12}
гига	Г	10^{9}
мега	М	10^{6}
кило	к	10^{3}
милли	м	10^{-3}
микро	мк	10^{-6}
нано	н	10^{-9}
пико	п	10^{-12}
фемто	ф	10^{-15}
атто	а	10^{-18}

Основные единицы системы СИ:

Метр (м)
Килограмм (кг)
Секунда (с)
Ампер (А)
Кельвин (К)
Моль (моль)
Кандела (новая свеча) (кд)
СИ — международная система единиц (Systeme International d'Unites)

б) в особых случаях умножением на фактор 10^1

Префикс	Символ	Множитель
гекто	г	10^{2}
дека	да	10^{1}
деци	д	10^{-1}
санти	с	10^{-2}

2. Атомные массы элементов

Название элемента	Символ	Атомная масса	Название элемента	Символ	Атомная масса
Азот	N	14,0067	Кадмий	Cd	112,40
Актиний	Ac	227	Калий	K	39,098
Алюминий	Al	26,9815	Калифорний	Cf	249
Америций	Am	243	Кальций	Ca	40,08
Аргон	Ar	39,948	Кислород	O	15,9994
Астат	At	210	Кобальт	Co	58,9332

Название элемента	Символ	Атомная масса	Название элемента	Символ	Атомная масса
Барий	Ba	137,34	Кремний	Si	28,086
Бериллий	Be	9,01218	Криптон	Kr	83,80
Берклий	Bk	297	Ксенон	Xe	131,30
Бор	B	10,811	Курчатовий	Ku	264
Бром	Br	79,904	Кюрий	Cm	247
Ванадий	V	50,9414	Лантан	La	138,9055
Висмут	Bi	208,9804	Литий	Li	6,94
Водород	H	1,0079	Лоуренсий	Lr	256
Вольфрам	W	183,85	Лютеций	Lu	174,97
Гадолиний	Gd	157,25	Магний	Mg	24,305
Галлий	Ga	69,72	Марганец	Mn	54,9380
Гафний	Hf	178,49	Медь	Cu	63,546
Гелий	He	4,00260	Менделевий	Md	257
Германий	Ge	72,59	Молибден	Mo	95,94
Гольмий	Ho	164,9340	Мышьяк	As	74,9216
Диспрозий	Dy	162,50	Натрий	Na	22,9897
Европий	Eu	151,96	Неодим	Nd	144,24
Железо	Fe	55,847	Неон	Ne	20,179
Золото	Au	196,9665	Нептуний	Np	237,0482
Индий	In	114,82	Никель	Ni	58,71
Иод	J	126,9045	Ниобий	Nb	92,9064
Иридий	Ir	192,22	Нобелий	No	255
Иттербий	Jb	173,04	Олово	Sn	118,69
Иттрий	J	88,9059	Осмий	Os	190,2
Палладий	Pd	106,4	Таллий	Tl	204,37
Платина	Pt	195,09	Тантал	Ta	180,9479
Плутоний	Pu	242	Теллур	Te	127,60
Полоний	Po	210	Тербий	Tb	158,9254
Празеодим	Pr	140,9077	Технеций	Tc	99,97
Прометий	Pm	147,145	Титан	Ti	47,90
Протактиний	Pa	231,0359	Торий	Th	232,0381
Радий	Ra	226,0254	Тулий	Tu	168,9342
Радон	Rn	222	Углерод	C	12,011
Рений	Re	186,2	Уран	U	238,029
Родий	Rh	102,9055	Фермий	Fm	257
Ртуть	Hq	200,59	Фосфор	P	30,97376
Рубидий	Rb	85,4678	Франций	Fr	223
Рутений	Ru	101,07	Фтор	F	18,9984
Самарий	Sm	150,4	Хлор	Cl	35,453
Свинец	Pb	207,2	Хром	Cr	51,996
Селен	Se	78,96	Цезий	Cs	132,9054
Сера	S	32,06	Церий	Ce	140,12
Серебро	Ag	107,868	Цинк	Zn	65,38
Скандий	Sc	44,9559	Цирконий	Zr	91,22
Стронций	Sr	87,62	Эйнштейний	Es	254,253
Сурьма	Sb	121,75	Эрбий	Er	167,26

3. Молекулярные и эквивалентные массы веществ в окислительно-восстановительном титровании

Исходное вещество		Конечный продукт	Число эквивалентов в молекуле	Молекулярная масса	Эквивалентная масса
название	формула				
Окислители					
Хлор	Cl_2	HCl	2	71	35,5
Бром	Br_2	HBr	2	160	80
Йод	I_2	HI	2	254	127
Гипохлорит натрия (хлорноватистокислый натрий)	$NaClO$	$NaCl$	2	74,5	37,25
Хлорат калия (хлорноватокислый калий)	$KClO_3$	KCl	6	122,6	20,4
Перманганат калия (марганцовокислый калий)	$KMnO_4$	MnO (в форме соли)	5	158	31,6
Дихромат калия (двухромовокислый калий)	$K_2Cr_2O_7$	Cr_2O_3 (в форме соли)	6	294	49
Перекись водорода	H_2O_2	H_2O	2	34	17
Хлорид железа (III) (хлорное железо)	$FeCl_3$	$FeCl_2$	1	162,2	162,2
Восстановители					
Сульфат железа (II) (сернокислое железо закисное)	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	$Fe_2(SO_4)_3$	1	278	278
Щавелевая кислота	$H_2C_2O_4 \cdot 2H_2O$	CO_2+H_2O	2	126	63
Оксалат натрия (щавелевокислый натрий)	$Na_2C_2O_4$	CO_2+NaOH	2	133,994	66,997
Тиосульфат натрия (серноватистокислый натрий)	$Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$	$Na_2S_4O_6$	1	248	248

4. Количество эритроцитов и лейкоцитов крови здоровых животных

Вид животных	Эритроциты, млн/мкл	Лейкоциты, тыс/мкл
Крупный рогатый скот	5,0—7,5	4,5—12,0
Овцы	7,0—12,0	6,0—14,0
Козы	12,0—17,0	6,0—12,0
Свиньи	6,0—7,5	8,0—16,0
Лошади	6,0—9,0	7,0—12,0
Куры	3,0—4,0	20,0—40,0
Собаки	5,8—8,4	8,5—10,5
Кошки	6,6—9,4	10,0—15,0

5. Лейкограмма крови у здоровых животных, %

Вид животных	Базофилы	Эозинофилы	Нейтрофилы			Лимфоциты	Моноциты
			юные	палочкоядерные	сегментоядерные		
Крупный рогатый скот	0,0—2,0	3—8	0—1	2—5	20—35	40—75	2—7
Лошади	0,0—1,0	2—6	0—0,5	3—6	45—62	25—44	2—4
Свиньи	0,3—0,8	4—12	0—2	3—6	25—35	40—50	2—5
Овцы	0,0—1,0	1—4	0—2	2—4	40—48	40—50	2—6
Козы	0,0—2,0	2—8	1—4	5—20	20—40	40—70	2—5
Собаки	0,0—1,0	2,5—9,5	—	1—6	43—72	21—40	1—5
Кошки	0,0—1,0	2—8	0—1	3—9	40—45	36—51	1—5

6. Нормативы биохимических показателей крови взрослых животных

Показатель	Единицы измерения	Крупный рогатый скот	Овцы	Свиньи	Лошади	Куры
		Цельная кровь				
Гемоглобин	г%	9,9—12,9	7,9—11,9	9,9—11,9	9,0—14,9	8,9—12,9
	г/л	99—129	79—119	99—119	90—149	89—129
Гематокрит	%	35—45	35—45	39—43	35—45	39—42
Глюкоза	мг%	40—60	40—60	80—100	75—95	89—140
	ммоль/л	2,22—3,33	2,22—3,33	3,33—5,55	3,05—5,27	1,44—7,77
Кетоновые тела	мг%	1,06—6,0	1,0—3,0	0,5—2,5	—	—
	г/л	0,01—0,06	0,01—0,03	0,005—0,025	—	—
В том числе:						
бета-оксимасляная кислота	мг%	2,8—4,6	0,8—2,3	0,4—2,0	—	—
	г/л	0,008—0,046	0,008—0,023	0,004—0,02	—	—
ацетоуксусная кислота и ацетон	мг%	0,2—1,4	0,2—0,7	0,1—0,5	—	—
	г/л	0,002—0,014	0,002—0,007	0,001—0,005	—	—
Кобальт	мкг%	3,0—5,0	3,0—5,0	2,5—5,0	2,5—5,0	2,0—3,0
	мкмоль/л	0,51—0,85	0,51—0,85	0,43—0,85	0,43—0,85	0,36—0,51
Марганец	мкг%	15—25	2—8	2—10	—	—
	мкмоль/л	2,73—4,55	0,36—1,45	0,36—1,82	—	—
Медь	мкг%	90—110	50—70	—	35—45	50—70
	мкмоль/л	14,1—17,3	7,9—11,0	—	3,51—7,08	7,9—11,0
Скорость оседания эритроцитов по Панченкову	мм/ч	0,5—1,5	0,5—1,0	2—9	40—70	2—3
Скорость свертывания крови	мин	5—6	8—10	10—15	8—10	1,5—2
		Сыворотка крови				
Азот аминокислот	мг%	4—6	4—6	6—8	5—7	
	ммоль/л	2,85—4,28	2,85—4,28	4,28—5,70	3,57—4,99	
Аскорбиновая кислота (витамин С)	мг%	0,6—1,5	0,4—0,8	0,2—1,2	0,2—1,5	
	мкмоль/л	34—85	23—45	11—68	[illegible]	

Продолжение

Показатель	Единицы измерения	Крупный рогатый скот	Овцы	Свиньи	Лошади	Куры
Белок общий	г%	7,2—8,6	6,5—7,5	7,0—8,5	7,0—7,8	4,3—5,9
	г/л	72—86	65—75	70—85	70—78	43—59
В том числе:						
альбумины	%	38—50	35—50	40—55	35—45	31—35
альфа-глобулины	%	12—20	13—20	14—20	14—18	17—19
бета-глобулины	%	10—16	7—11	16—21	20—26	11—13
гамма-глобулины	%	25—40	20—46	17—26	18—24	35—37
Билирубин	мг%	0,01—0,3	0,01—0,3	0,08—0,3	0,8—1,6	0,01—0,1
	мкмоль/л	0,17—5,13	0,17—5,13	1,37—5,13	13,7—27,36	0,17—1,71
Йод связанный с белком (СБИ)	мкг%	4—8	4—8	4—6	2—4	—
	нмоль/л	315—630	350—630	315—473	157,6—315,2	
Кальций общий	мг%	10—12,5	10—12,5	10—14	10—14	8—12
	ммоль/л	2,5—3,13	2,5—3,13	2,5—3,5	2,5—3,5	2—3,0
Каротин:						
в пастбищный период	мг%	0,9—2,8	—	—	—	—
в стойловый период	мг%	0,4—1,0	—	—	—	—
Креатинин	мг%	0,45—0,65	0,6—1,1	0,7—1,9	0,9—1,8	1,4—4,0
Липиды общие	мг%	280—600	—	400—350		360—2100
бета-липопротеиды	%	65—70				
фосфолипиды общие	мг%	70—250		90—200		
Триглицериды	мг%	20—50		20—80		
Молочная кислота	мг%	9—13	9—11	9—11	5—13	8—10
	ммоль/л	1—1,44	1—1,44	1—1,44	0,56—1,44	0,89—1,10

Продолжение

Показатель	Единицы измерения	Крупный рогатый скот	Овцы	Свиньи	Лошади	Куры
Магний	мг%	2—3	2—3	2,5—3,5	2,0—3,5	2,0—3,0
	ммоль/л	0,82—1,23	0,82—1,23	1,03—1,44	0,82—1,44	0,82—1,23
Мочевина	мг%	20—40	20—36	20—35	20—35	14—22
	ммоль/л	3,3—6,7	3,3—5,8	3,3—5,8	3,3—5,8	2,3—3,7
НЭЖК	мг%	3—15		8—20		6—10
Пировиноградная кислота	мг%	0,8—1,7	0,8—1,7	0,6—1,3		
	мкмоль/л	114—193	114—193	68—148		
Ретинол:						
в пастбищный период	мкг%	40—150				
	мкмоль/л	1,4—5,3				
в стойловый период	мг%	24—80				
	мкмоль/л	0,8—2,8				
Фосфор неорганический	мкг%	4,5—6,0	4,5—6,0	4,0—6,0	4,2—5,5	5,5—7,5
	ммоль/л	1,45—1,94	1,45—1,84	1,29—1,94	1,35—1,78	1,78—2,42
Холестерин	мг%	50—170	60—140	60—110	55—100	80—200
	ммоль/л	1,30—4,42	1,56—3,64	1,56—2,86	1,43—2,60	2,8—5,2
		Плазма крови				
Натрий	мг%	320—340	320—340	320—340	310—350	350—380
	ммоль/л	139—148	139—148	139—148	135—143	152—165
Калий	мг%	16—19	16—19	16—19	19—22	19—23
	ммоль/л	4,10—4,86	4,10—4,86	4,10—4,86	4,86—5,63	4,86—5,89
Щелочной резерв	об% CO_2	46—66	40—60	45—55	50—65	45—55

7. Коэффициенты пересчета единиц, подлежащих замене, в рекомендуемые единицы по международной системе (СИ)

Вещество	Относительная молекулярная масса	Обозначение единиц		Коэффициент пересчета в рекомендуемые единицы	Коэффициент пересчета иной единицы в строку
		подлежащих замене	рекомендуемых		
Кровь, сыворотка, плазма					
Аланинаминотрансфераза	—	мкмоль/ч. мл мкмоль/ч. мл	ммоль/ч. л. нмоль/с. л.	1,0000 278,00	— —
Аспартатаминотрансфераза	—	мкмоль/ч. мл мкмоль/ч. мл	ммоль/ч. л. нмоль/с. л.	1,0000 278,00	— —
Азот аминокислот	14,0	мг%	ммоль/л	0,7139	1,401
Аскорбиновая кислота (витамин С)	176,126	мг%	мкмоль/л	56,78	0,0176
Общий белок	—	г%	г/л	10,000	0,1
Билирубин	584,881	мг%	мкмоль/л	17,10	0,05847
Гемоглобин	16114,5	г% г%	г/л ммоль/л	10,000 0,6206	— 1,611
Глюкоза	180,16	мг%	ммоль/л	0,0555	18,02
Йод белковосвязанный	126,91	мкг%	нмоль/л	78,795	0,0127
Калий	39,102	мг%	ммоль/л	0,256	
Кальций	40,08	мг%	ммоль/л	0,2500	4,00
Кобальт	58,93	мкг%	мкмоль/л	0,17	5,88
Кетоновые тела	—	мг%	г/л	0,01	100
Креатинин	113,12	мг%	ммоль/л	0,088	11,363
Лейкоциты	—	тыс. в 1 мкл	10^9/л		—
Липиды общие	—	мг%	г/л	0,01	100
Лактатдегидрогеназа	—	мкмоль/ч. мл	ммоль/ч. л	1,0000	—
Мочевая кислота	168,11	мг%	ммоль/л	0,0590	16,94

Вещество	Относительная молекулярная масса	Обозначение единиц		Коэффициент пересчета в рекомендуемые единицы	Коэффициент пересчета из рекомендуемых единиц в старые
		подлежащих замене	рекомендуемых		
Марганец	54,939	мкг%	мкмоль/л	0,182	5,494
Магний	24,312	мг%	ммоль/л	0,4110	2,431
Медь	63,546	мг%	мкмоль/л	0,1574	6,355
Мочевина	60,06	мг%	ммоль/л	0,1665	6,006
Молочная кислота	90,079	мг%	ммоль/л	0,110	9,008
Натрий	22,989	мг%	ммоль/л	0,4350	2,299
Пировиноградная кислота	83,063	мг%	мкмоль/л	113,6	0,00806
Ретинол (витамин А)	296,456	мкг%	мкмоль/л	0,03491	28,65
Тироксин	776,874	мкг%	нмоль/л	12,87	0,07769
Токоферол	416,685	мг%	мкмоль/л	24	0,04167
Триглицериды	875	мг%	ммоль/л	0,011	90,91
Фосфатаза щелочная	—	мкмоль/ч. мл	ммоль/ч. л	1,0000	—
		мкмоль/мин. мл	ммоль/ч. л	16,667	—
Фосфор неорганический	30,9738	мг %	ммоль/л	0,3230	3,097
Фосфолипиды	774	мг%	ммоль/л	0,01292	7,740
Хлор	35,453	мг%	ммоль/л	0,2820	3,545
Холестерин	386,64	мг%	ммоль/л	0,0260	38,67
Цинк	65,38	мкг%	мкмоль/л	0,154	6,49
Эритроциты	—	млн в 1 мкл	10^{12}/л	—	—

Для пересчета старой единицы в новую или новой единицы в старую известную величину умножают на коэффициент. Например, необходимо 10 мг% кальция сыворотки крови перевести в ммоль/л. Для этого 10 умножают на 0,2500 и получают 2,5 моль/л; или 2,5 ммоль/л нужно перевести в мг%, для этого 2,5 умножают на 4,00 и получают 10 мг%.

Если коэффициент неизвестен, то старые единицы переводят в новые, пользуясь формулами: при переводе мг% (мг/100 мл) в ммоль: $\frac{n \cdot 10}{M}$, где n — количество вещества в 100 мл; 10 — перевод на 1 л; M — относительная молекулярная (атомная) масса вещества. При переводе мг% в мкмоль/л применяют формулу: $\frac{n \cdot 10^4}{M}$; при переводе мкг% в мкмоль/л используют формулу: $\frac{n \cdot 10}{M}$; при переводе мкг% в нмоль/л: $\frac{n \cdot 10^4}{M}$, обозначения те же.

8. Вспомогательная таблица по расчету содержания азота нитратов (мг/кг почвы) при соотношении почвы и раствора 1 : 2,5 на основе формулы: (N-NO_3 мг/кг = Antilog (4,54—pNO_3)

pNO_3	мг/кг	pNO_3	мг/кг	pNO_3	мг/кг	pNO_3	мг/кг	pNO_3	мг/кг	pNO_3	мг/кг
2,55	97,7	2,86	47,9	3,16	24,0	3,45	12,3	3,76	6,0	4,07	3,0
2,56	95,5	2,87	46,8	3,17	23,4	3,46	12,0	3,77	5,9	4,08	2,9
2,57	93,3	2,88	45,7	3,18	22,9	3,47	11,8	3,78	5,8	4,09	2,8
2,58	91,2	2,89	44,7	3,19	22,4	3,48	11,5	3,79	5,6	4,10	2,8
2,59	89,1	2,90	43,6	3,20	21,9	3,49	11,2	3,80	5,5	4,11	2,7
2,60	87,1	2,91	42,7	3,21	21,4	3,50	11,0	3,81	5,4	4,12	2,6
2,61	85,1	2,92	41,7	3,22	20,9	3,51	10,7	3,82	5,2	4,13	2,6
2,62	83,2	2,93	40,7	3,23	20,4	3,52	10,5	3,83	5,1	4,14	2,5
2,63	81,3	2,94	39,8	3,24	20,0	3,53	10,2	3,84	5,0	4,15	2,5
2,64	79,4	2,95	38,9	3,25	19,5	3,54	10,0	3,85	4,9	4,16	2,4
2,65	77,6	2,96	38,0	3,26	19,1	3,55	9,8	3,86	4,8	4,17	2,3
2,66	75,9	2,97	37,2	3,27	18,6	3,56	9,6	3,87	4,7	4,18	2,3
2,67	74,1	2,98	36,3	3,28	18,2	3,57	9,3	3,88	4,6	4,19	2,2
2,68	72,4	2,99	35,5	3,29	17,8	3,58	9,1	3,89	4,5	4,20	2,2
2,69	70,8	3,00	34,7	3,30	17,4	3,59	8,9	3,90	4,4	4,21	2,1
2,70	69,2	3,01	33,9	3,31	17,0	3,60	8,7	3,91	4,3	4,22	2,1
2,71	67,6	3,02	33,1	3,32	16,6	3,61	8,5	3,92	4,2	4,23	2,0
2,72	66,1	3,03	32,4	3,33	16,2	3,62	8,3	3,93	4,1	4,24	2,0
2,73	64,6	3,04	31,6	3,34	15,9	3,63	8,1	3,94	4,0	4,25	1,9
2,74	63,1	3,05	30,9	3,35	15,5	3,64	7,9	3,95	3,9	4,26	1,9
2,75	61,7	3,06	30,2	3,36	15,1	3,65	7,8	3,96	3,8	4,27	1,9
2,76	60,3	3,07	29,5	3,37	14,8	3,66	7,6	3,97	3,7	4,28	1,8
2,77	58,9	3,08	28,8	3,38	14,5	3,67	7,4	3,98	3,6	4,29	1,8
2,78	57,5	3,09	28,2	—	—	3,68	7,2	3,99	3,5	4,30	1,7
2,79	56,2	3,10	27,5	—	—	3,69	7,1	4,00	3,5	—	—
2,80	55,0	3,11	26,9	3,39	14,1	3,70	6,9	4,01	3,4	—	—
2,81	53,7	—	—	3,40	13,8	3,71	6,8	4,02	3,3	—	—
2,82	52,5	3,12	26,3	3,41	13,5	3,72	6,6	4,03	3,2	—	—
2,83	51,3	3,13	25,7	3,42	13,2	3,73	6,5	4,04	3,2	—	—
2,84	50,1	3,14	25,1	3,43	12,9	3,74	6,3	4,05	3,1	—	—
2,85	49,0	3,15	24,6	3,44	12,6	3,75	6,2	4,06	3,0		

9. Вспомогательная таблица по расчету содержания азота нитритов (мг/кг сухого растительного материала) при соотношении пробы и экстрагирующего раствора 1:100 на основе формулы: $N—NO_3$ мг/кг = Antilog (6,15—pNO_3)

pNO_3	мг/кг	pNO_3	мг/кг	pNO_3	мг/кг	pNO_3	мг/кг	pNO_3	мг/кг	pNO_3	мг/кг	pNO_3	мг/кг
2,16	9772	2,46	4898	2,76	2455	3,06	1230	3,36	616,6	3,66	309,0	3,96	154,9
2,17	8550	2,47	4786	2,77	2399	3,07	1202	3,37	602,6	3,67	302,0	3,97	151,4
2,18	9333	2,48	4677	2,78	2344	3,08	1175	3,38	588,8	3,68	295,1	3,98	147,9
2,19	9120	2,49	4571	2,79	2291	3,09	1148	3,39	575,4	3,69	288,4	3,99	144,5
2,20	8913	2,50	4467	2,80	2239	3,10	1122	3,40	562,3	3,70	281,8	4,00	141,3
2,21	8710	2,51	4365	2,81	2188	3,11	1096	3,41	549,5	3,71	275,4	4,01	138,0
2,22	8511	2,52	4266	2,82	2138	3,12	1072	3,42	537,0	3,72	269,2	4,02	134,9
2,23	8318	2,53	4169	2,83	2089	3,13	1047	3,43	524,8	3,73	263,0	4,03	131,8
2,24	8128	2,54	4074	2,84	2042	3,14	1023	3,44	512,9	3,74	257,0	4,04	128,8
2,25	7943	2,55	3981	2,85	1995	3,15	1000	3,45	501,2	3,75	251,2	4,05	125,9
2,26	7762	2,56	3890	2,86	1950	3,16	977,2	3,46	489,8	3,76	245,5	4,06	123,0
2,27	7586	2,57	3802	2,87	1905	3,17	955,0	3.47	478,6	3,77	239,9	4,07	120,2
2,28	7413	2,58	3715	2,88	1862	3,18	993,3	3,48	467,7	3,78	234,4	4,08	117,5
2,29	7244	2,59	3631	2,89	1820	3,19	912,0	3,49	457,1	3,79	229,1	4,09	114,8
2,30	7079	2,60	3548	2,90	1778	3,20	891,3	3,50	446,7	3,80	223,9	4,10	112,2
2,31	6918	2,61	3467	2,91	1738	3,21	871,0	3,51	436,5	3,81	218,8	4,11	109,6
2,32	6761	2,62	3388	2,92	1698	3,22	851,1	3,52	426,6	3,82	213,8	4,12	107,2
2,33	6607	2,63	3311	2,93	1660	3,23	931,8	3,53	416,9	3,83	208,9	4,13	104,7
2,34	6457	2,64	3236	2,94	1622	3,24	812,8	3,54	407,4	3,84	204,2	4,14	102,3
2,35	6310	2,65	3162	2,95	1585	3,25	794,3	3,55	398,1	3,85	199,5	4,15	100,0
2,36	6166	2,66	3090	2,96	1549	3,26	776,2	3,56	389,1	3,86	195,0		
2,37	6026	2,67	3020	2,97	1514	3,27	758,6	3,57	380,2	3,87	190,5		
2,38	5888	2,68	2951	2,98	1479	3,28	741,3	3,58	371,5	3,88	186,2		
2,39	5754	2,69	2884	2,99	1445	3,29	724,4	3,59	363,1	3,89	182,0		
2,40	5623	2,70	2818	3,00	1413	3,30	707,9	3,60	354,8	3,90	177,8		
2,41	5495	2,71	2754	3,01	1380	3,31	691,8	3,61	346,7	3,91	173,8		
2,42	5370	2,72	2692	3,02	1349	3,32	676,1	3,62	338,8	3,92	169,8		
2,43	5248	2,73	2630	3,03	1318	3,33	660,7	3,63	331,1	3,93	166,0		
2,44	5129	2,74	2570	3,04	1288	3,34	645,7	3,64	323,6	3,94	162,2		
2,45	5012	2,75	2512	3,05	1259	3,35	631,0	3,65	316,2	3,95	158,5		

10. Вспомогательная таблица по расчету содержания азота нитратов (мг/кг сырого растительного материала) при соотношении пробы и экстрагирующего раствора 1:4 на основе формулы: $N—NO_3$ = Antilog (4,75 — pNO_3)

pNO_3	мг/кг	pNO_3	мг/кг	pNO_3	мг/кг	pNO_3	мг/кг	pNO_3	мг/кг	pNO_3	мг/кг	pNO_3	мг/кг	pNO_3	мг/кг	pNO_3	мг/кг	pNO_3	мг/кг	pNO_3	мг/кг
1,00	5623	1,40	2239	1,80	891,3	2,20	354,8	2,60	141,3	3,00	56,2	3,40	22,4	3,80	8,9	4,20	3,5	4,60	1,4
1,01	5493	1,41	2188	1,81	871,0	2,21	346,7	2,61	138,0	3,01	54,9	3,41	21,9	3,81	8,7	4,21	3,5	4,61	1,4
1,02	5370	1,42	2138	1,82	851,1	2,22	338,8	2,62	134,9	3,02	53,7	3,42	21,4	3,82	8,5	4,22	3,4	4,62	1,3
1,03	5248	1,43	2089	1,83	831,8	2,23	331,1	2,63	131,8	3,03	52,5	3,43	20,9	3,83	8,3	4,23	3,3	4,63	1,3
1,04	5129	1,44	2042	1,84	812,8	2,24	323,6	2,64	128,8	3,04	51,3	3,44	20,4	3,84	8,1	4,24	3,2	4,64	1,3
1,05	5012	1,45	1995	1,85	794,3	2,25	316,2	2,65	125,9	3,05	50,1	3,45	20,0	3,85	7,9	4,25	3,2	4,65	1,3
1,06	4898	1,46	1950	1,86	776,2	2,26	309,0	2,66	123,0	3,06	49,0	3,46	19,5	3,86	7,8	4,26	3,1	4,66	1,2
1,07	4786	1,47	1905	1,87	758,6	2,27	302,0	2,67	120,2	3,07	47,9	3,47	19,1	3,87	7,6	4,27	3,0	4,67	1,2
1,08	4677	1,48	1862	1,88	741,3	2,28	295,1	2,68	117,5	3,08	46,8	3,48	18,6	3,88	7,4	4,28	3,0	4,68	1,2
1,09	4571	1,49	1820	1,89	724,4	2,29	288,4	2,69	114,8	3,09	45,7	3,49	18,2	3,89	7,2	4,29	2,9	4,69	1,1
1,10	4467	1,50	1778	1,90	707,9	2,30	281,8	2,70	112,2	3,10	44,7	3,50	17,8	3,90	7,1	4,30	2,8	4,70	1,1
1,11	4365	1,51	1738	1,91	691,8	2,31	275,4	2,71	109,6	3,11	43,7	3,51	17,4	3,91	6,9	4,31	2,8	4,71	1,1
1,12	4266	1,52	1698	1,92	676,1	2,32	269,2	2,72	107,2	3,12	42,7	3,52	17,0	3,92	6,8	4,32	2,7	4,72	1,1
1,13	4169	1,53	1660	1,93	660,7	2,33	263,0	2,73	104,7	3,13	41,7	3,53	16,6	3,93	6,6	4,33	2,6	4,73	1,1
1,14	4074	1,54	1622	1,94	645,7	2,34	257,0	2,74	102,3	3,14	40,7	3,54	16,2	3,94	6,5	4,34	2,6	4,74	1,0
1,15	3981	1,55	1585	1,95	631,0	2,35	251,2	2,75	100,0	3,15	39,8	3,55	15,9	3,95	6,3	4,35	2,5	4,74	1,0

Продолжение

pNO_3	мг/кг	pNO_3	мг/кг	pNO_3	мг/кг	pNO_3	мг/кг	pNO_3	мг/кг	pNO_3	мг/кг	pNO_3	мг/кг	pNO_3	мг/кг	pNO_3	мг/кг	pNO_3	мг/кг
1,16	3890	1,56	1549	1,96	616,6	2,36	245,5	2,76	97,7	3,16	38,9	3,56	15,5	3,96	6,2	4,36	2,5	4,75	1,0
1,17	3802	1,57	1514	1,97	602,6	2,37	239,9	2,77	95,5	3,17	38,0	3,57	15,1	3,97	6,0	4,37	2,4	—	—
1,18	3715	1,58	1479	1,98	588,8	2,38	234,4	2,78	93,3	3,18	37,2	3,58	14,8	3,98	5,9	4,38	2,3	—	—
1,19	3631	1,59	1445	1,99	575,4	2,39	229,1	2,79	91,2	3,19	36,3	3,59	14,4	3,99	5,8	4,39	2,3	—	—
1,20	3548	1,60	1413	2,00	562,3	2,40	223,9	2,80	89,1	3,20	35,5	3,60	14,1	4,00	5,6	4,40	2,2	—	—
1,21	3467	1,61	1380	2,01	549,5	2,41	218,8	2,81	87,1	2,21	34,7	3,61	13,8	4,01	5,5	4,41	2,2	—	—
1,22	3388	1,62	1349	2,02	537,0	2,42	213,8	2,82	85,1	3,22	33,9	3,62	13,5	4,02	5,4	4,42	2,1	—	—
1,23	3311	1,63	1318	2,03	524,8	2,43	208,9	2,83	83,2	3,23	33,0	3,63	13,2	4,03	5,2	4,43	2,1	—	—
1,24	3236	1,64	1288	2,04	512,9	2,44	204,2	2,84	81,3	3,24	32,4	3,64	12,9	4,04	5,1	4,44	2,0	—	—
1,25	3162	1,65	1259	2,05	501,2	2,45	199,5	2,85	79,4	3,25	31,6	3,65	12,6	4,05	5,0	4,45	2,0	—	—
1,26	3090	1,66	1230	2,06	489,8	2,46	195,0	2,86	77,6	3,26	30,9	3,66	12,3	4,06	4,9	4,46	1,9	—	—
1,27	3020	1,67	1202	2,07	478,6	2,47	190,5	2,87	75,9	3,27	30,2	3,67	12,0	4,07	4,8	4,47	1,9	—	—
1,28	2951	1,68	1175	2,08	467,7	2,48	186,2	2,88	74,1	3,28	29,5	3,68	11,8	4,08	4,7	4,48	1,9	—	—
1,29	2884	1,69	1148	2,09	457,1	2,49	182,0	2,89	72,4	3,29	28,8	3,69	11,5	4,09	4,6	4,49	1,8	—	—
1,30	2818	1,70	1122	2,10	446,7	2,50	177,8	2,90	70,8	3,30	28,2	3,70	11,2	4,10	4,5	4,50	1,8	—	—
1,31	2754	1,71	1096	2,11	436,5	2,51	173,8	2,91	69,2	3,31	27,5	3,71	11,0	4,11	4,4	4,51	1,7	—	—
1,32	2692	1,72	1072	2,12	426,6	2,52	169,8	2,92	67,6	3,32	26,9	3,72	10,7	4,12	4,3	4,52	1,7	—	—
1,33	2630	1,73	1047	2,13	416,9	2,53	166,0	2,93	66,1	3,33	26,3	3,73	10,5	4,13	4,2	4,53	1,7	—	—
1,34	2570	1,74	1023	2,14	407,4	2,54	162,2	2,94	64,6	3,34	25,7	3,74	10,2	4,14	4,1	4,54	1,6	—	—
1,35	2512	1,75	1000	2,15	398,1	2,55	158,5	2,95	63,1	3,35	25,1	3,75	10,0	4,15	4,0	4,55	1,6	—	—
1,36	2455	1,76	977,2	2,16	389,0	2,56	154,9	2,96	61,7	3,36	24,6	3,76	9,8	4,16	3,9	4,56	1,5	—	—
1,37	2399	1,77	955,0	2,17	380,2	2,57	151,4	2,97	60,3	3,37	24,0	3,77	9,6	4,17	3,8	4,57	1,5	—	—
1,38	2344	1,78	933,3	2,18	371,5	2,58	147,9	2,98	58,9	3,38	23,4	3,78	9,3	4,18	3,7	4,58	1,5	—	—
1,39	2291	1,79	912,0	2,19	363,1	2,59	144,5	2,99	57,5	3,39	22,9	3,79	9,1	4,19	3,6	4,59	1,4	—	—

11. Вспомогательная таблица по расчету содержания нитратов (мг/л) в водах на основе формулы: $N—NO_3$—Antilog (4,19—pNO_3)

pNO_3	мг/л	pNO_3	мг/л	pNO_3	мг/л	pNO_3	мг/л	pNO_3	мг/л	pNO_3	мг/л	pNO_3	мг/л
4,00	1,5	3,65	3,5	3,30	7,8	2,95	17,4	2,60	38,9	2,25	87,1	1,90	195,0
3,99	1,6	3,64	3,5	3,29	7,9	2,94	17,8	2,59	39,8	2,24	89,1	1,89	199,5
3,98	1,6	3,63	3,6	3,28	8,1	2,93	18,2	2,58	40,7	2,23	91,2	1,88	204,2
3,97	1,7	3,62	3,7	3,27	8,3	2,92	18,6	2,57	41,7	2,22	93,3	1,87	208,9
3,96	1,7	3,61	3,8	3,26	8,5	2,91	19,1	2,56	42,7	2,21	95,5	1,86	213,8
3,95	1,7	3,60	3,9	3,25	8,7	2,90	19,5	2,55	43,7	2,20	97,7	1,85	218,8
3,94	1,8	3,59	4,0	3,24	8,9	2,89	20,0	2,54	44,7	2,19	100,0	1,84	223,9
3,93	1,8	3,58	4,1	3,23	9,1	2,88	20,4	2,53	45,7	2,18	102,3	1,83	229,1
3,92	1,9	3,57	4,2	3,22	9,3	2,87	20,9	2,52	46,8	2,17	104,7	1,82	234,4
3,91	1,9	3,56	4,3	3,21	9,6	2,86	21,4	2,51	47,9	2,16	107,2	1,81	239,9
3,90	2,0	3,55	4,4	3,20	9,8	2,85	21,9	2,50	49,0	2,15	109,6	1,80	245,5
3,89	2,0	3,54	4,5	3,19	10,0	2,84	22,4	2,49	50,1	2,14	112,2	1,79	251,2
3,88	2,0	3,53	4,6	3,18	10,2	2,83	22,9	2,48	51,3	2,13	114,8	1,78	257,0
3,87	2,1	3,52	4,7	3,17	10,5	2,82	23,4	2,47	52,5	2,12	117,5	1,77	263,0
3,86	2,1	3,51	4,8	3,16	10,7	2,81	24,0	2,46	53,7	2,11	120,2	1,76	269,2
3,85	2,2	3,50	4,9	3,15	11,0	2,80	24,6	2,45	55,0	2,10	123,0	1,75	275,4
3,84	2,2	3,49	5,0	3,14	11,2	2,79	25,1	2,44	56,2	2,09	125,9	1,74	281,8
3,83	2,3	3,48	5,1	3,13	11,5	2,78	25,7	2,43	57,5	2,08	128,8	1,73	288,4
3,82	2,3	3,47	5,2	3,12	11,8	2,77	26,3	2,42	58,9	2,07	131,8	1,72	295,4

Продолжение

pNO_3	мг/л	pNO_3	мг/л	pNO_3	мг/л	pNO_3	мг/л	pNO_3	мг/л	pNO_3	мг/л	pNO_3	мг/л
3,81	2,4	3,46	5,4	3,11	12,0	2,76	26,9	2,41	60,3	2,06	134,9	1,71	302,0
3,80	2,5	3,45	5,5	3,10	12,3	2,75	27,5	2,40	61,7	2,05	138,0	1,70	309,0
3,79	2,5	3,44	5,6	3,09	12,6	2,74	28,1	2,39	63,1	2,04	141,3	1,69	316,2
3,78	2,6	3,43	5,8	3,08	12,9	2,73	28,8	2,38	64,6	2,03	144,5	1,68	323,6
3,77	2,6	3,42	5,9	3,07	13,2	2,72	29,5	2,37	66,1	2,02	147,9	1,67	331,1
3,76	2,7	3,41	6,0	3,06	13,5	2,71	30,2	2,36	67,6	2,01	151,4	1,66	338,8
3,75	2,8	3,40	6,2	3,05	13,8	2,70	30,9	2,35	69,2	2,00	154,9	1,65	346,7
3,74	2,8	3,39	6,3	3,04	14,1	2,69	31,6	2,34	70,8	1,99	158,5	1,64	354,8
3,73	2,9	3,38	6,5	3,03	14,5	2,68	32,4	2,33	72,4	1,98	162,2	1,63	363,1
3,72	3,0	3,37	6,6	3,02	14,8	2,67	33,1	2,32	74,1	1,97	166,0	1,62	371,5
3,71	3,0	3,36	6,8	3,01	15,1	2,66	33,9	2,31	75,9	1,96	169,8	1,61	380,2
3,70	3,1	3,35	6,9	3,00	15,5	2,65	34,7	2,30	77,6	1,95	173,8	1,60	389,0
3,69	3,2	3,34	7,1	2,99	15,9	2,64	35,5	2,29	79,4	1,94	177,8	1,59	398,1
3,68	3,2	3,33	7,2	2,98	16,2	2,63	36,3	2,28	81,3	1,93	182,0	1,58	407,4
3,67	3,3	3,32	7,4	2,97	16,6	2,62	37,2	2,27	83,2	1,92	186,0	1,57	416,9
3,66	3,4	3,31	7,6	2,96	17,0	2,61	38,0	2,26	85,1	1,91	190,5	1,56	426,6
												1,55	436,5
												1,54	446,7
												1,53	457,1
												1,52	467,7
												1,51	478,6
												1,50	489,8

12. Показатели молозива и молока здоровых коров

Показатель	Ед. измерения	Молоко	Молозиво					
			1-го удоя	1-го дня	2-го дня	3-го дня	4-го дня	5-го дня
Кислотность	°Т	16—19		40,0	33,0	27,3	23,1	21,6
Кетоновые тела	мг%	4—8	2—6	—	—	—	—	6—8
Каротин	мкг%	8—28	110—400	—	—	—	—	—
Магний	мг%	11—15	25—33	—	—	—	—	15—17
Мочевина	мг%	20—40	15—20	—	—	—	—	18—24
Кальций общий	мг%	125—130	260—180	235—152	183—147	181—141	176—140	168—90,0
Белок общий	%	2,7—5,0	22,5	14,8	9,4	5,8	4,0	3,9
Ретинол	мкг%	13—3,5	150—580	—	—	—	—	—
Сахар молочный	%	4,0—5,6	—	3,0	3,6	3,9	4,1	4,1
Токоферол	мкг%	8—10	—	—	—	—	—	—
Фосфор неорганический	мг%	60—65	152—96	160—90	128—80	109—70	97—69	—
pH		6,3—6,5	—	—	—	—	—	—
Натрий	мг%	36—63	—	—	—	—	—	—
Калий	мг%	140—180	—	—	—	—	—	—

13. Константы биохимических показателей содержимого рубца (взрослые животные)

Показатели	Крупный рогатый скот	Овцы
Сухое вещество в цельном содержимом рубца, %	3,50—5,50	4,00—9,37
Сухое вещество в рубцовой жидкости, %	1,96—3,20	2,00—4,66
pH	6,0—7,3	6,2—7,3
Летучие жирные кислоты, ммоль/100 мл	6,0—14,0	5,0—15,0
Соотношение кислот, молярный %:		
уксусная	55,0—70,0	55,0—65,0
пропионовая	15,0—20,0	15,0—22,0
изомасляная	0,6—1,5	0,5—1,5
масляная	10,0—15,0	10,0—15,0
изовалериановая	1,0—3,0	1,0—3,0
валериановая	1,0—3,0	1,0—4,0
капроновая	0—1,2	0—1,2
Азот:		
общий в цельном содержимом, мг%	100—300	120—350
общий в рубцовой жидкости, мг%	50—240	60—250
небелковый, мг%	15—60	10—50
белковый, мг%	35—200	40—240
аммонийный, мг%	5—20	5—30
Аммиак, мг%	6,5—25,0	6,5—35,0
Азот нитрата, мг%	0,017—0,054	0,012—0,090
Азот нитрита, мг%	0,010—0,016	0,005—0,008
Молочная кислота, ммоль/100 мл	следы —0,20	следы —0,15
Редуцирующие сахара, мг%	0—50,0	1,0—50,0
Общие липиды, мг%		
Количество бактерий в мл	100—400	100—450
Количество простейших, тыс. в 1 мл	10^9—10^{10}	10^9—10^{10}
Газы рубца, %:	200—1200	250—1800
CO_2	50—70	50—70
CH_4	20—40	20—35
$O_2 + N_2$	5—15	5—10

УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ (ИСТОЧНИКИ)

1. **Адо А. Д.** Патофизиология фагоцитов.— М.: Медгиз, 1961.
2. **Алексеев В. Н.** Количественный анализ.— М.: Химия, 1972.
3. **Алешин Б. В.** Гистофизиология гипоталамо-гипофизарной системы.— М.: Медгиз, 1971.
4. **Аликаев В. А., Петухова Е. А., Халенева Л. Д.** и др. Руководство по контролю качества кормов и полноценности кормления животных.— М.: Колос, 1967.
5. **Алимарин И. П., Ушакова Н. Н.** Справочное пособие по аналитической химии.— М.: МГУ, 1977.
6. Анализаторы жидких сред. — М.: Каталог ЦНИИТЭИ приборостроения, 1977.

7—8. **Архипов А. В., Антонов А. А.** Изучение липидов и липидного обмена у сельскохозяйственных животных и птиц с применением тонкослойной и газожидкостной хроматографии.— М.: Труды ВАСХНИЛ, 1979.

9. **Архипов А. В** Сб. науч. трудов МВА. — М.: 1973, т. 110, с. 10—104.
10. **Байматов В. Н., Савойский А. Г.** Применение современных биохимических методов исследования в ветеринарии.— М.: МВА, 1980.
11. **Балаховский С. Д., Балаховский М. С.** В кн.: Методы химического анализа крови.— М., 1959.
12. **Беляков И. М., Обухов Л. М., Белов В. И.** Методические рекомендации по лабораторным методам исследования мочи сельскохозяйственных животных.— М.: ВАСХНИЛ, 1980.
13. **Беляков И. М.** Диагностика внутренних незаразных болезней сельскохозяйственных животных.— М.: Колос, 1975.
14. **Бергфилд Г., Сторрс Э.** Газовая хроматография в биохимии.— М., 1964.
15. **Берзин Т.** Биохимия гормонов.— М.: Мир, 1964.
16. Биохимические методы исследования в клинике./Под редакцией **А. А. Покровского.**— М.: Медицина, 1969.
17. **Блинов Н. И.** Ускоренные методы окраски розеткообразующих клеток (РОК) периферической крови.— Сб. научн. трудов МВА, т. 17. М., 1980.
18. **Блинов Н. И.** Методические рекомендации по определению неспецифической резистентности у новорожденных телят.— М.: МВА, 1982.
19. **Блинов Н. И.** Микрометод определения фагоцитарной активности клеток крови. В кн.: Фагоцитоз и иммунитет. Тезисы докладов Всесоюзного симпозиума, посвященного 100-летию создания И. И. Мечниковым фагоцитарной теории иммунитета.— М.: Минздрав СССР, 1983.
20. **Блинов Н. И.** В кн.: Фагоцитоз и иммунитет. Тезисы докладов Всесоюзного симпозиума, посвященного 100-летию создания И. И. Мечниковым фагоцитарной теории иммунитета.— М.: Минздрав, 1983.
21. **Блинов Н. И., Преображенский С. Н., Ершова Н. В., Вышинский Г. В.** В кн.: Профилактика и лечение заболеваний молодняка сельскохозяйственных животных. Научн. труды ВАСХНИЛ.— М.: Колос, 1974.
22. **Бредикис Ю. Ю.** Очерки клинической электроники. — М.: 1974.
23. **Бриккер В. Н.** Лабораторное дело, 1961, № 7, с. 3.
24. **Бриль Э. Я.** Методы радиолигандного анализа гормонов. Вестн. акад. наук БССР. Серия с.-х. наук, 1977, № 1.
25. **Бурсун Г. Д., Марков Б. Н.** Основы метрологии.— М., 1975.

26—27. **Валуйский П. П.** Аминокислоты в питании телят.— Фрунзе: Илим. 1981.
28. **Волков Д. Т.** Новые методы и модификации биохимических исследований в животноводстве.— М., 1970.
29. **Воскресенский П. И.** Техника лабораторных работ. — Л.: Химия, 1973.
30. **Георгиевский В. И., Анненков Б. Н., Самохин В. Т.** Минеральное питание животных.— М.: Колос, 1979.
31. **Давидов Р. Б.** Молоко и молочное дело.— М.: Колос, 1972.
32. **Даштаянц Г. А.** Клиническая гематология. — Киев:. Здоровье, 1978.
33. **Деликторская Л. Н., Добрянская Л. Д.** Унификация лабораторных методов исследования. Научн. труды 1-го Московского медицинского института.— М., 1978, вып. 8.
34. **Дмитриев В. Б., Степанов Г. С., Герасимова Г. Г., Голубев А. К., Юрченко О. П.** Принципы оценки потенциальных резервов функции желез внутренней секреции как критерия количественной характеристики фено- и генотипа животных. В кн.: Гормоны в животноводстве.— М.: Колос, 1977.
35. **Догель В. А.** Простейшие. Малоресничные инфузории.— Л., 1929.
36. **Дубинская Н. И., Иванов И. С.** Радиоиммунологический метод определения гормона роста в сыворотке крови крупного рогатого скота. Доклады ТСХА.— М., 1979, вып. 255.
37. **Жаров А. В., Кондрахин И. П.** Кетоз молочных коров.— М.: Россельхозиздат, 1983.
38. Жирорастворимые витамины и методы их определения в биологических субстратах. (Методические указания).— Боровск, 1979, с. 68—69.
39. **Жуховицкий А. А., Туркельтауб Н. М.** Газовая хроматография.—М., 1966.
40. Иммунобиология, иммунохимия, иммунопатология./Под ред. **И. Месробяну и Шт. Берчану.**— Изд. Ак. соц. республики Румынии, 1977.
41. Иммунологические методы./Под ред. **Х. Фримеля** (перев. с немецкого) — М.: Мир, 1979.
42. **Кисляк Н. С., Ленская Р. В.** Клетки крови у детей в норме и патологии.— М.: Медицина, 1978.
43. Внутренние незаразные болезни животных.— Л.; Колос, 1972.
44. **Кондрахин И. П.** Науч. труды МВА, 1963.
45. **Кондрахин И. П.** Анализ молока при диагностике кетоза у коров. Ветеринария, 1976, № 8.
46. **Кондрахин И. П.** Ветеринария, 1978, № 2, с. 94—97.
47. **Колб В. Г., Камышников В. С.** Клиническая биохимия.— Минск: Беларусь, 1976.
48. Контроль качества клинических лабораторных исследований./Сб. под ред. **В. В. Меньшикова.**— М., 1977.
49. **Коробов А. В., Макарь В. И.** Этиология, диагностика и профилактика патологии обмена веществ высокопродуктивных животных. Сб. научн. трудов МВА.— М., 1982.
50. **Коромыслов В. Ф., Кудрявцева Л. А.** Ветеринария, 1972, № 7, с.112—113.
51 **Коромыслов В. Ф., Кудрявцева Л. А.** Ветеринария, 1972, № 10, с. 119.
52. **Коромыслов В. Ф., Кудрявцева Л. А.** Экспресс-метод определения каротина в плазме крови.— Ветеринария, 1973, № 2.
53. **Крейцер А. Г.** Руководство по эксплуатации медицинских измерительных приборов.— Л.: Медицина, 1980.
54. **Кроткова А. П., Митин Н. И.** Определение летучих жирных кислот в содержимом рубца у жвачных. Вестник с.-х. науки, 1957, № 10.
55 **Кроткова А. П., Курилов Н. В., Портнова Н. Г.** Определение молочной кислоты в содержимом рубца и крови. Вестник с.-х. науки, 1966, № 8.
56 **Крохалев А. А.** Лабораторное дело, 1961, № 5, с. 12.
57. **Кузнецов С. Г.** Ветеринария, 1973, № 7, с. 103—105.
58. **Курилов Н. В., Кроткова А. П.** Физиология и биохимия пищеварения жвачных.— М.: Колос, 1971.

59. **Курилов Н. В., Материкин А. М., Фирсов В. И., Щеголев С. Я.** Хроматографический анализ летучих жирных кислот рубцовой жидкости у жвачных. Вестник с.-х. науки, 1974, № 9.
60. **Курилов Н. В., Севастьянова Н. А.** Пищеварение у жвачных. В сб.: Итоги науки и техники (Серия животноводство и ветеринария).— М., 1978, т. 11.
61. **Курилов Н. В., Севастьянова Н. А., Коршунов В. Н.** и др. Изучение пищеварения у жвачных (методические указания).— Боровск, 1979.
62. Лабораторные исследования в ветеринарии.— М.: Колос, 1974.
63. **Лебенгарц Я. З.** Автоматические анализаторы для исследований крови. Животноводство, 1983, № 3.
64. **Леликов Ю. С.** Физико-химические методы анализа.— М., 1974.
65. **Ливенсон А. Р.** Электробезопасность медицинской техники.— М., 1975.
66. Лимфоциты: выделение, фракционирование и характеристика./Под ред. **Дж. Б. Натвинга** и др., перевод с англ.— М.: Медицина, 1980.
67. **Лукашик Н. А., Тащилин В. А.** Зоотехнический анализ кормов.— М., 1965.
68. **Лурье Ю. Ю.** Справочник по аналитической химии.— М.: Химия, 1979.
69. Методические рекомендации. Определение содержания пировиноградной кислоты по модифицированному методу Фридмана и Хаугена.— М.: ЦОЛИУ врачей, 1976.
70. Методические указания по применению унифицированных клинических лабораторных методов исследования./Под редакцией **В. В. Меньшикова**.— М., 1973.
71. Методические указания по применению унифицированных клинических лабораторных методов исследований.— М.: Минздрав СССР, 1977.
72. Методические указания по диагностике, профилактике и лечению отравлений сельскохозяйственных животных нитратами и нитритами.— М.: МСХ [redacted], 1979.
73. Методические указания по применению унифицированных биохимических методов исследований крови, мочи и молока в ветеринарных лабораториях.— М.: МСХ [redacted], 1981.
74. Методические указания по определению азота нитратов и нитритов в почвах, природных водах, кормах и растениях.— М.: МСХ [redacted] (ЦИНАО), 1981, с. 42—50.
75. Методика изучения состава молока коров. ВНИИ животноводства.— Дубровицы, 1969.
76. Методы биохимических исследований (Учебное пособие)./Под ред. **Прохоровой М. И.**— Л.: 1982.
77. Методы биохимических исследований.— Л.: Изд-во Ленингр. университета, 1982.
78. Методы исследований в иммунологии./Под ред. **И. Лефковится** и **Б. Перниса** (пер. с англ.).— М.: Мир, 1981.
79. **Михайлова С. П.** Унификация лабораторных методов исследования. Научн. труды 1-го Московского мед. института.— М., 1978, вып. VIII.
80. **Назаренко И. И., Фролова Л. А., Леонова Л. А., Суслова Р. Г., Зайцева В. П.** Высокочувствительный метод определения селена в биологических материалах (методические рекомендации) — М.: МВА, 1982.
81. **Неустроев М. П.** Т- и В-системы иммунитета у мелкого рогатого скота с возрастом и при бруцеллезе. Автореферат на соискание ученой степени канд. ветеринарных наук.— Новосибирск, 1980.
82. **Ногаре С. Д., Джувят Р. С.** Газожидкостная хроматография.— Л., 1966.
83—84. Об унификации клинических лабораторных методов исследований.— М.: Минздрав СССР, 1972, 1981.
85. **Островский Ю. М., Богданов Н. Г., Дмитровский А. А.** и др. Экспериментальная витаминология. — Минск: Наука и техника, 1979.
86. **Петрова А. Т., Абрамова Т. К.** Ветеринария, 1979, № 2, с. 74.
87. **Петров П. Е.** Ветеринария, 1974, № 1, с. 89—92.
88. **Петрунькина А. М.** Практическая биохимия. — Л., 1961.

89. **Петрухин И. В.** Труды Смоленской НИВС, 1960, вып. 1, с. 198—199.
90. **Плотникова Н. М.** Унификация лабораторных методов исследований. Научные труды 1-го Московского мед. института, 1978, выпуск 8.
91. **Пономарев В. Д.** Аналитическая химия.— М.: Высшая школа, 1982, № 2.
92. **Прохоров В. Ф., Смирнов С. И., Шарабрин И. Г., Данилевский В. М.** и др. Внутренние незаразные болезни с.-х. животных.— М.: Колос, 1976.
93. Последние достижения в клинической иммунологии./Под ред. **Р. А. Томпсона** (пер. с англ.).— М.: Медицина, 1983.
94. **Постников В. С.** Исследования крови у животных и их клиническое толкование. М.: МВА, 1978.
95. **Предтеченский В. Е.** Руководство по клиническим лабораторным исследованиям.— М.: Медицина, 1964.
96. Проведение цитологических, химических и иммунохимических исследований лимфоцитов и их мембран у крупного рогатого скота (методические рекомендации).— М.: ВАСХНИЛ, 1982.
97. **Прокофьев М. И.** Регуляция размножения сельскохозяйственных животных.— Л.: Наука, 1983.
98. **Прохорова М. И., Тупикова М. И.** Большой практикум по углеводно-липидному обмену.— Л., 1965.
99. **Пустовой В. К.** Хроматографические определения жирных кислот в кормах и биологических субстратах у сельскохозяйственных животных (методические указания).— Боровск, 1979.
100. **Радченков В. П.** и др. Эндокринологические аспекты гормональной стимуляции откорма животных в условиях промышленной технологии. В кн.: Гормоны в животноводстве.— М.: Научн. труды ВАСХНИЛ, Колос, 1977.
101. **Радченков В. П.** и др. Гормональный профиль быков черно-пестрой породы в связи с мясной продуктивностью.— М.: Доклады ВАСХНИЛ, 1978, № 8.
102. **Радченков В. П.** и др. Определение гормонов в крови молодняка крупного рогатого скота и его гормональный статус.— Боровск, 1980.
103. **Радченков В. П., Бутров Е. В., Сапунова Е. Г.** и др. Содержание нуклеиновых кислот в мышечной ткани, инсулина и тироксина в крови свиней. В кн.: Породы свиней./Под ред. **П. Е. Ладана, А. Т. Мысика.**— М.: Колос, 1981.
104. **Разумов В. А.** Массовый анализ кормов.— М., 1982.
105. **Резников А. Г.** Методы определения гормонов.— Киев, Наукова думка, 1980.
106. **Рихтер В., Вернер Э., Бэрх.** Основные физиологические показатели у животных и технология содержания (пер. с немец.).— М.: Колос, 1982.
107—108. **Розен В. Б.** Взаимодействие кортизола с транскортином при эндокринных заболеваниях. В кн.: Современные вопросы эндокринологии.— М.: Медицина, 1969.
109. Руководство по клиническим лабораторным исследованиям./Под ред. **Е. А. Кост** и **Л. Г. Смирновой.**— М.: Медицина, 1964.
110—111. Руководство по клинической лабораторной диагностике./Под ред. **В. В. Меньшикова.**— М.: Медицина, 1982.
112. **Сентебова Н. А., Медведева Л. А., Александровская Т. Н.** Унификация лабораторных методов исследования. Научные труды 1-го Московского мед. института, вып. VIII.— М., 1978.
113. **Смирнов А. М., Конопелько П. Я., Постников В. С.** и др. Клиническая диагностика внутренних незаразных болезней с.-х. животных.— Л.: Колос, 1981.
114. **Смирнов А. М.** и др. Практикум по клинической диагностике внутренних незаразных болезней сельскохозяйственных животных.— Л.: Колос, 1978.
115. **Смирнов А. М., Дугин Г. Л.** Учебное пособие по лабораторным диагностическим исследованиям содержимого преджелудков и желудка, кала и мочи у животных.— Л., 1974.

116. **Симонов П. В.** Три фазы ответных реакций организма на возрастающий стимул.— М.: Медицина, 1963.
117. **Соколов Я. А., Абрамова В. В., Федотов В. П.** Радиоиммунологический метод определения гормона роста и инсулина в плазме крови с использованием принципа двойных антител. Проблемы эндокринологии, 1971, вып. 18, № 5.
118. **Соловьев В. И., Кузнецова Г. Н., Волкова А. Г.** и др. Методы количественного определения содержания нитратов в мясопродуктах. В кн.: Новые методы технологического контроля в колбасном производстве.— М., 1961.
119—120. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования./Под ред. **Е. А. Кост.**— М.: Медицина, 1975.
121. **Тараненко А. Г.** Пролактин и лактация сельскохозяйственных животных. В кн.: Эндокринология и трансплантация зигот сельскохозяйственных животных.— М.: Колос, 1982.
122. **Тодоров И.** Клинические лабораторные методы в педиатрии.— София, 1968.
123. **Туголуков В. Н.** Современные методы функциональной диагностики состояния слизистой оболочки желудка и их клиническое значение.— М., 1965.
124. **Федотов В. П., Соколов Я. А.** Радиоиммунологический метод определения белковых и полипептидных гормонов в плазме крови. Проблемы эндокринологии. 1970, т. 16, № 4.
125. **Фостер Э. М., Нельсон Ф. Ю., Спекк М. Л.** и др. Микробиология молока (пер. с англ.).— М., 161.
126—127. **Фишзон-Рысс Ю. И.** Современные методы исследования желудочной секреции.— Л.: 1972.
128. **Хромов В. А., Спасов А. А., Сяткин С. П.** Лабораторное дело, 1976, № 10, с. 584.
129—130. **Шлимович П. В., Авенирова З. А.** Радиоиммунологический метод определения инсулина. Проблемы эндокринологии. 1972, т. 18, № 6.
131. **Чард Т.** Радиоиммунологические методы (пер. с англ.).— М.: Мир, 1981.
132. Экспериментальная витаминология (справочное руководство).— Минск: Наука и техника, 1979.
133. **Юдаев Н. А.** Биохимия гормонов и гормональной регуляции.— М.: Наука, 1976.

134. **Bartlett J. R.** J. Biol. Chem., 1959, 234, 466.
135. **Bolton A. K., Hunter W. M.** Biochem G., 1973, 133, 529.
136. **Burstein M., Samaille G.** Compt. Roud Acad. Sc., 1955, 241, 664—665.
137. **Dawood M. J., Raghawan K. S.** Radioimmunoassay of oxytocin. J. Endocrinology, 1978, 76, p. 261—270.
138. **Mc. Ewan, E. W. Fisher, J. E. Selman and W. S. Penhale.** Clinica chemical acta. Amsterdam, 1970, v. 27. N 1—3, p. 155.
139. **Erlanger B. F.** Phormacol. Rev. 1973, v. 25, p. 271—280.
140. **Faiman C., Ryan R. J.** J. Clin. Endocrinol and Metabol., 1967, 27, N 3, p. 444—447.
141. **Franchimont P.** Jn. Methods of hormone analysis. Stuttgart: Thieme, 1976, p. 36—46.
142. **Garel J. M., Care A. D. et al.** J. Endocrinol., 1974, 62, p. 497—509.
143. **Greenwood F. C., Hunter W. M.**, Biochem J., 1963, 89, p. 114—123.
144. **Guy E., Abraham.** Clinical and biochemical analysis. v. 5, Chapter 10, 1977, p. 319—390.
145. **Guy E., Abraham.** Clinical and biochemical analisis. v. 5, Chapter 20, p. 591—656, 1977.
146. **Hargis G. K., Bowser E. N. et al.** Endocrinology., 1974, 94, N. 6, p. 1644—1649.
147. **Harl C., Bines J. A., Norant S. V.** Journal of Dairy Science., v. 62, N. 2, 1979.

148. **Herbert V., Lau K. S., Gottlieb Ch. W., Bleicher Sh. S.** J. Clin. Endocrinology and Metabol., 1965, 25, N. 10, p. 1375—1384.
149. **Laurell S., Tibbling J.** Clinical Clumica Acta, 1967, 16, 57—62.
150. **Liunggeren J. G., Perason B.** et al. Acta endocrinology., 1976, 81, p. 487—494.
151. **Midgley A. R.** J. Clin. Endocrinol and Metabol., 1967, 27, N. 2, p. 295—299.
152. **Odell W. D., Wilber J. F.** et al. J. Clin. Endocrinol and Metabol. 1965, 25, p. 1179—1188.
153. **Sardesai V. M., Manning J. A.** Clinical Chemistry, 1968, 14, N. 2 p. 156—161.
154. **Scow R., Chernick S.** Comprehensive biochemistry. Eds. Florkina. Stotz, 1970, v. 18, p. 20—50.
155. **Yalow R. S., Berson S. A.** J. Clin. Juvest., 1960, 39, N. 7, p. 1157—1175
156. **Ylow R. S.** Nature, 1959, 184, 4699, p. 1648—1649.

Абсорбциометрия 49
Авитаминозы 5
Аденозинтрифосфат (АТФ) 6, 12, 26
Адреналин 13, 19
Адсорбенты 34, 46
Азот аминокислот 78
— мочевины 69
— мочи 169
— остаточный 13, 14
Азот содержимого рубца 187, 188, 270
— — белковый, определение 191
— — небелковый 190
— — общий 189
Азотемия 14
Азотистый обмен 12
Активные формы кальциферола (витамина D) 24
Аланинаминотрансфераза (АлАТ) 134
Алиментарная остеодистрофия 22
Алостерический центр ферментов 6
α-Амилаза сыворотки крови, мочи и дуоденального содержимого 139
Аминный азот крови 78
Аминокислоты 6, 13, 15
Аминотрансферазы 6, 13, 136
Аммиак 13, 14
— мочи 170
Аммиак содержимого рубца 188, 270
Аммонийный азот содержимого рубца 188, 189
Анаэробная стадия окисления углеводов 10
Анемии 28
Антивитамины 5
Антикоагулянты крови 57
Антисыворотка 229
Апоферменты 6
Аппарат для определения кетоновых тел 92
— — — молочной кислоты 186
Аппарат Маркгама 181
Ареометры 40
Аскорбиновая кислота 134
Аспартатаминотрансфераза (АсАТ) сыворотки крови 134
Ассимиляция (анаболизм) 4
Атония преджелудков 30
Атомно-абсорбционные спектрофотометры 51, 52
Атомные массы элементов 254
Ахилия 200
Ацетил-коэнзим-А (ацетил-КоА) 10
Ацетоацетил-КоА 12
Ацетон 93
Ацетоновые тела молока (молозива) 156
Ацетоновые (кетоновые) тела мочи 165
— проба Ланге 165
— проба Лестраде 165
Ацетоуксусная кислота 12
— определение 93
Ацидоз рубца 21
Аэробное окисление углеводов 10, 12, 14

Базальная секреция 198
Бактерии содержимого рубца 195
Безбелковый фильтрат крови по Сомоджи 93
Белок мочи, обнаружение и определение 162
— метод Брандберга — Бобертса — Стольникова 162
— проба кипячением 162
— проба с сульфасалициловой кислотой 162
Белки плазмы крови 13
Белково-образовательная функция печени 27
Белковые фракции сыворотки крови 73
— диспротеинемия 74
— определение методом электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы 73
— определение турбидиметрическим (нефелометрическим методом) 74
Беломышечная болезнь 23, 125, 126
Бета-липопротеиды 101, 102
Бета-оксимасляная кислота 12
— определение 93
Билирубин 83
— мочи 166
Билирубин-эталон 82
Биосинтез белков 13
— нейтральных жиров 12
Биохимические методы 3

— показатели содержимого рубца 270
Бихроматная смесь 92
Болезни печени 27
Болезни почек и мочевыводящих путей 28
— органов пищеварения 30
— сердца 29
Бумага фильтровальная 34
Буферная емкость 45
Буферные растворы (для определения pH рубцового содержимого) 179
Буферные смеси 45
Бюретки 32, 43
Бюхнера воронка 32

Вазопрессин 16
Валериановая кислота рубцового содержимого 184, 270
Величина pH 202
Взрывоопасные вещества 47
Витамин А крови 5, 126
Витамин А молока (молозива) 157
Витамин B_1 (тиамин) 6, 128
Витамин B_2 (рибофлавин) 6
Витамин B_{12} 17
Витамин B_6 (пиридоксин) 6
Витамин С крови 133
Витамины 5
Водопоглощающие вещества 35
Возгонка реактивов 34
Вторичная остеодистрофия коров 18
— — бычков (эндогенная) 19
Высушивание 35
— в сушильных шкафах 35
— в эксикаторе 35
— до постоянной массы 35
— на воздухе 35

Газожидкостная хроматография ЛЖК 183
Газожидкостные хроматографы 52
Галактоза 9
Гель-фильтрация 45
Гематокрит 65
— определение с помощью микроцентрифуги 65
— определение микрометодом в модификации И. Тодорова 66
Гематурия 28
Гемоглобин крови 65
Гемопоэз 63
Гепатоз 28
Гипергликемия 86
Гиперкалиемия 114
Гиперкератоз 200
Гиперпротеинемия 72
Гиперсекреция 200
Гиперхолестеринемия 100
Гиповитаминоз А 24
Гиповитаминоз B_1 25
Гиповитаминоз B_2 26
Гиповитаминоз С (скорбут, цинга) 26
Гипогликемия 86
— поросят 20
Гиповитаминоз D (рахит) 24
Гиповитаминоз Е 25
Гиповитаминоз К 25
Гипокалиемия 114
Гипокальциемия 108
Гипокобальтоз 23
Гипокупроз 24
Гипомагниемия 22, 112
— диагностические тесты 23
Гипопротеинемия 71
Гипосекреция 200
Гипосульфит (тиосульфат) 123
Гипотония преджелудков 30
Гликогенолиз 9
Гликолиз 9
Глицерин 11
Глицерофосфат 12
γ-Глутамилтранспептидаза сыворотки крови 142
Глюкагон 19
Глюкоза крови 85
Глюкоза мочи 86
Глюкозурия 19, 20
Глюконеогенез 9
Гормоны 5,9
Грамм-эквивалент 37

Дебит HCl 204
Детоксикационная функция печени 27
Дефицит HCl 204
Диабет 20, 12, 19
Диазореактив 81, 82
Диспепсия 30
Диспротеинемия 74
Дистрофия миокарда 29
Дихромат калия 32

Единицы СИ 261

Железо 6, 121
Желчные пигменты мочи 165
— проба Розина 165
— проба Фуше 165
Жирные кислоты 11

Зернистые цилиндры 175
Зонды для взятия проб содержимого рубца 177

Избыточность селена 23
Изовалериановая кислота рубцового содержимого 184, 270
Изомасляная кислота рубцового содержимого 184, 270
Изоферменты 7

Ингибиторы ферментов 8
Индикан мочи 168
— проба Обермейера 169
— проба Яффе 168
Индикатор Ташира, приготовление 188
Индикаторы 44
Инсулин 19, 237
Инфузории, подсчет общего количества в содержимом рубца, видовой состав 194
Ионизированный кальций крови 109
Йод 23, 118
Йод, связанный с белком крови (СБИ) 117

Кадаверин 13
Калий 15
— крови 115
Калий и натрий в биологических жидкостях 112
Кальций 15
Кальций ионизированной крови, определение 109
— молока (молозива) 157
— мочи 173
— общий крови 106
Кальцийсвязующий белок 24
Капроновая кислота рубцового содержимого 184, 200
Каротин сыворотки крови 127, 128
Катаболизм (диссимиляция) 4
Кетоз 18
Кетоновые тела крови 92
— определение ацетона и ацетоуксусной кислоты 93
— определение бета-оксимасляной кислоты 93
Кетоновые тела молока 156
Кислота серная 47
Кислотно-основное равновесие 15
Кислотность молока 157
Кислый катар 202
Кобальт 23
— крови 116
— определение 116, 117
— клиническое значение 117
Количество эритроцитов и лейкоцитов крови здоровых животных 257
Константы биохимических показателей рубцового содержимого 270
Кортизол 240
Кортикостероиды 16
Кортикостерон 16
Кортикотропин (АКТГ) 9, 246
Коферменты 5, 6
Коэнзимы 6
Коэффициент распределения 34
Коэффициенты пересчета единиц, подлежащих замене, в рекомендуемые единицы по Международной системе (СИ) 261
Креатин крови, определение 80
Кребса цикл 10
Крезол 13
Кристаллизация реактивов 35
Кровяные пигменты мочи, обнаружение 167, 168
— проба с бензидином 168
— проба с гваяколовой смолой 167
Кьельдаля колба 32

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) сыворотки крови, 7, 136
Лейкограмма 63
— крови здоровых животных 257
Лейкозы (гемобластозы) 31
Лейкопедез 209
Лейкоцитоз 60
Летучие жирные кислоты (ЛЖК) рубцового содержимого 180—185
Лиганд 200
Лимфолейкоз 31
Лимфоцитоз 64
Липиды 11, 94
Лютеинизирующий гормон (ЛГ) 250

Магний 16, 22
— молока (молозива) 157
— сыворотки крови 111
Мазки крови 61, 62, 63
— микроскопическое исследование 63
— окраска по Нохту 62
— окраска по Паппенгейму 62
— окраска по Романовскому—Гимзе 62
Марганец 17, 22, 120
— крови 119
Масляная кислота рубцового содержимого 184, 270
Материалы фильтрующие 33, 34
Медь 24, 120, 121
Медь и железо крови 120
Метаболизм 9, 12, 15
Метаболиты 4
Металлоферменты 6, 8
Меченый лиганд 200
Микроорганизмы рубцового содержимого 193
Микроспектрофотометры 50
Микроэлементы 15, 16
Минеральные вещества 15
Миоглобин 21
Миоглобинурия 21
Миокардит 30
Миокардоз 30
Молекулярные и эквивалентные массы веществ в окислительно-восстановительном титровании 256
Молочная кислота 10
— крови 88
— рубцового содержимого 185, 270

Молярная концентрация реактивов 35, 36
Моль 35
Моносахариды 9
Моча (физико-химические свойства) 160
Мочевая кислота 14
— крови 79
Мочевина молока (молозива) 157
Мочевинообразовательная функция печени 27
Мочекаменная болезнь 28
Мытье химической посуды 32, 33

Натр едкий, хранение растворов 48
Натрий крови 115
Небелковые азотистые компоненты крови 13
Недостаточность и избыточность селена 23
Недостаточность никотиновой кислоты (рр-гиповитаминоз, пеллагра) 26
Недостаточность пиридоксина 26
Недостаточность цианкобаламина (B_{12}-гиповитаминоз) 26
Нейтрофильный лейкоцитоз 64
Некоторые единицы Международной системы (СИ) и их обозначения 254
Неорганический фосфор сыворотки крови (определение) 109
Нефелометрия 49
Нефрит 28
Нефроз 28
Неэтерифицированные жирные кислоты (НЭЖК) 18, 27, 100—106
Никотинамидадениндинуклеотид (НАД) 6
Нитратный азот в почвах, кормах, природных водах и биологических субстратах 151
— определение ионометрическим экспресс-методом 151—155
Нитраты в кормах, крови, молоке и патологическом материале 147
— определение с использованием реактива Грисса 147
— в рубцовом содержимом 191
Нитриты в кормах, крови и патологическом материале 149, 191
— определение с использованием реактива Грисса 149
Новорожденные животные 211
— клеточный иммунитет Т- и В-лимфоциты 215—220
— методы исследований 211, 222
— фагоцитоз клеток крови 212, 213
— физиологические показатели крови и мочи 222, 223
Нормальность растворов 36
Нормативы биохимических показателей крови взрослых животных 258, 260
Нуклеотиды 6

Общий белок сыворотки крови 70
Общий кальций сыворотки крови 106
Объемный анализ, расчеты 43
Окраска мазков крови 61
Окситоцин 245
Определение резервной щелочности диффузионным методом с помощью сдвоенных колб по И. П. Кондрахину 67
Определение резервной щелочности крови с помощью титратора Т-110 68
Оптико-аналитические приборы 49
Осаждение белков в содержимом рубца 186, 190, 192
— сахаров в содержимом рубца 186
Основной обмен 4
Остаточный азот 69
Остаточный азот крови 69
Оценка функций печени 27

Парааминобензойная кислота 5
Паратгормон 236
Парентеральный стимулятор 198
Пастбищная тетания 22
Пентозофосфатный путь окисления глюкозы 11
Пепсин 205
Пепсиноген 208
Перегонка (дистилляция) реактивов 35
Перекристаллизация реактивов 35
Пероз (скользящий сустав) 120
Перикардит 29
Перманганат калия, расчет эквивалентов 39, 40
Пилорус 202
Пировиноградная кислота 10, 87
Плазма крови 57
Пламенные фотометры 51
Пластинки силикагельные 46
Плотность мочи 160
Подготовка предметных стекол 61
Показатели молозива и молока здоровых животных 269
Показатель pH рубцового содержимого 178, 179, 180, 185, 188
Полипептиды 14
Полирибосомы 13
Поляриметры 50
Помощь при ожогах и отравлении 48
Послеродовая гематурия коров 29
— гипокальциемия 20
Послеродовой парез 20
Посуда химическая (общего и специального назначения, мерная) 32

Почечные камни 176
Почечные цилиндры 174
Правила «креста» (диагональной схемы) 41
Приготовление безбелкового фильтрата по Сомоджи 93
Приготовление индикаторов 44
Проба Богомолова 167
— Гайенсена 163
— Ланге 165
— Лестраде 165
— с гваяколовой смолой 167
— мочи с сульфасалициловой кислотой 162
— мочи на миоглобин 168
— Ниляндера 164
— Обермейра 169
— Розена 165
— Флоренса 167
Проба Фуше 165
— Яффе 168
Провитамины 5
Пролактин 252
Пропионовая кислота рубцового содержимого 184, 270
Простагландины 9
Простейшие содержимого рубца 193
Простетическая группа 5, 6
Путресцин 13

Радиоиммунологический анализ 226
Растворение 35
Растворы 35, 49
— для выделения лимфоцитов 217, 218
— Олсвера 218
— осмоляльность 216
— плотность 215
— разведение 36, 41, 42, 43
— расчеты при приготовлении 38—43
— смешивание 41, 42, 43
— титрованные 37, 43
— точные 35, 36, 38
— Хенкса 218
— хранение 38, 47, 48
Реактив Грисса 147
Реактивы 33—35, 47
Резервная щелочность крови 67
— определение диффузионным методом с помощью сдвоенных колб по И. П. Кондрахину 67
— определение с помощью титратора Т-110 68
Рибозофосфат 11
Рилизинг-фактор 19

Сахар крови 10, 85, 86
Сахар мочи, обнаружение и определение 163, 164
— метод индикаторных бумажек 164
— метод Ниляндера 164
— поляриметрический метод 164
— проба Гайнеса 163
Сахарные нагрузки 90
Сахарный диабет 12, 19
СБИ (йод, связанный с белком) сыворотки крови 23, 118
Связующий агент (см. антисыворотка)
Сдвоенные колбы (для определения резервной щелочности крови) 67
Секретин 17
Селен 124
— определение в почвах, кормах, крови и других биологических материалах 124, 125
Сефадекс 45
Сиаловые кислоты крови 90
Силикагель (приготовление) 46
Сифоны 47
Скорбут (цинга) 26
Скорость оседания эритроцитов 66
— определение микрометодом Панченкова 66
Соматотропный гормон (СТГ) 251
Сорбитолдегидрогеназа сыворотки крови 140
Спектрофлюориметры атомно-абсорбционные 50
Спектрофотометры 50
Стимулированная секреция 198
Сублимация (возгонка) 34
Сушка химической посуды 33
Сыворотка крови 57

Тестостерон 243
Тетрапирроловые ферменты 6
Техника безопасности 47, 48
Техника приготовления мазка крови 61
Тиамин 25, 130
Тиамин крови и печени 128
Тиаминдифосфат (ТДМ) 130
Тиаминмонофосфат (ТМФ) 130
Тиаминпирофосфат 6, 25
Тиреокальцитонин 235
Тирозин 13
Тироксин 13, 234
Титр раствора 37, 43
Титратор Т-110 (для определения резервной щелочности крови) 69
Титрование, индикаторы 44
Токоферолы крови и тканей 130, 131
— определение свободного токоферола 131
— определение суммарного токоферола и его эфиров 131
Травяная тетания (гипомагниемия) 22
Триглицериды 11
— клиническое значение 99

— определение 97, 98, 105, 106
Трийодтиронин (T_3) 233
Триптофан 13
Турбидиметрия 43

Углеводный обмен 9
Уголь активированный 34
Уксусная кислота рубцового содержимого 184, 270
Уремия 77
Уробилин, уробилиноген мочи 167
— проба Богомолова 167
— проба Флоренса 167
Уровская болезнь 22
Уропепсин 204
Уропепсиноген 207

Ферменты 5—8
Фиксаналы (стандарт-титры) 38
Фильтрование 33, 34
— под вакуумом 34
Фильтры 34
Флавинадениндинуклеотид (ФАД) 6
Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) 248
Фосфолипиды 97, 105, 106
Фосфопиридоксаль 6
Фосфор молока (молозива) 157
— определение 109, 157
Фосфор неорганической крови 109
Фосфор (V) оксид 35
Фосфорилаза 10
Фруктоза 10
Фруктозо-1,6-дифосфатальдолаза сыворотки крови 143

Хлор 15
Хлориды мочи (определение) 172
Хлоркальциевые трубки 38
Холестерин общий 100—106
— свободный 100, 101
— этерифицированный 101
Холинэстераза 147
Холинэстераза сыворотки крови 145
— определение колориметрическим методом 145
— определение экспресс-методом с применением индикаторной бумаги 146
Хроматограф газожидкостный 183, 184
Хроматография летучих жирных кислот 182—185
— ЛЖК на колонке силикагеля 182
— тонкослойная 45, 46
Хромовая смесь 33

Цельная кровь (получение, подготовка) 57
Церулоплазмин 121
Цикл трикарбоновых кислот (цикл Кребса) 10
Цинк 17, 22, 124
Цинк крови 122
Цирроз печени 28
Цитохромы 6

Щелочная фосфатаза сыворотки крови 138
Щелочной катар 202
Щелочной резерв крови (см. резервная щелочность крови)
Щитовидная железа 9

ЭДТА-натрия (трилон Б) 57
Эквиваленты, расчет 36
Эксикатор 35
Экстракция реактивов 34, 35
Эндогенная остеодистрофия у бычков 19
Эндокринная система 9
Энзоотический зоб 23
Энергия активации 7
Энтеральный стимулятор 198
Эозинопения 64
Эозинофилия 64
Эпителий мочевых канальцев 175
Эритроциты здоровых животных 257

СОДЕРЖАНИЕ

Введение *(И. П. Кондрахин)* 3

Основные обменные процессы и их метаболиты *(Малахов А. Г.)* 4
Участие витаминов, ферментов и гормонов в обмене веществ 5
Продукты метаболизма углеводного и липидного обмена 9
Продукты метаболизма азотистого обмена 12
Связь между обменом белков, липидов и углеводов 14
Продукты метаболизма минерального обмена 15

Лабораторные клинические тесты при внутренних незаразных болезнях *(Кондрахин И. П.)* 18
Болезни нарушенного метаболизма 18
Болезни печени 27
Болезни почек и мочевыводящих путей 28
Анемии 28
Болезни сердца 29
Болезни органов дыхания 30
Болезни органов пищеварения 30
Лейкозы (гемобластозы) 31

Подготовка посуды и реактивов *(Фролова Л. А.)* 32
Подготовка посуды к анализам 32
Применение реактивов и их очистка 33
Приготовление и хранение точных растворов 35
Приготовление буферных смесей, колонок, силикагельных пластинок . . 45
Помощь при ожогах и отравлении 48

Использование приборов и лабораторного оборудования 49
Основные принципы работы электроизмерительных приборов 49
Основные правила установки и эксплуатации приборов 53
Инструментальные методы анализа крови 53

Лабораторные клинические методы исследования крови 57
Отбор и подготовка образцов крови к анализам *(Кондрахин И. П.)* . . . 57
Методы клинической гематологии 58
Подсчет эритроцитов в камере 58
Подсчет лейкоцитов в камере 59
Дифференциальный подсчет лейкоцитов (лейкограмма) 60
Определение гемоглобина крови гемоглобин-цианидным методом (с ацетонциангидрином) 65
Определение гематокрита 65
Определение времени свертывания крови 66
Определение скорости оседания эритроцитов (СОЭ) микрометодом Панченкова 66
Биохимические методы исследования крови *(Кондрахин И. П., Архипов А. В.)* 67
Показатели кислотно-щелочного состояния *(Кондрахин И. П.)* . . 67
Методы исследования белкового обмена 69
Определение общего белка сыворотки крови рефрактометрическим методом 70

Определение общего белка сыворотки крови по биуретовой реакции 72
Определение белковых фракций сыворотки крови методом электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы 73
Определение белковых фракции сыворотки крови турбидиметрическим (нефелометрическим) методом 74
Определение мочевины в сыворотке крови и моче по цветной реакции с диацетилмонооксимом 75
Определение свободного аминного азота в сыворотке крови по методу Г. А. Узбекова в модификации З. С. Чулковой 78
Определение мочевой кислоты в сыворотке крови по реакции с фосфорно-вольфрамовым реактивом 79
Определение креатинина в сыворотке крови по цветной реакции Яффе (метод *Поппера*) 80
Определение билирубина в сыворотке крови по диазореакции (метод *Иендрашика, Клеггорна и Грофа*) 81
Коллоидно-осадочные пробы 83
Сулемовая проба 84
Проба Вальтмана 84
Методы исследования углеводного обмена 85
Определение глюкозы в крови, моче по цветной реакции с ортотолуидином 85
Определение пировиноградной кислоты по модифицированному методу Фридемана и Хаугена 87
Определение молочной кислоты в крови (по *Баркеру и Саммерсону*) 88
Функциональные пробы для оценки состояния углеводного обмена 90
Определение сиаловых кислот в сыворотке крови по реакции с резорцином 90
Определение кетоновых тел в крови йодометрическим методом . . . 92
Методы исследования липидного обмена *(Архипов А. В.)* 94
Выделение липидов из биологических субстратов 94
Определение классов липидов 96
Разделение липидов на классы методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) 102
Количественное определение классов липидов методом денситометрии 105
Методы исследования минерального обмена (макроэлементов) *(Кондрахин И. П.)* 106
Определение общего кальция в сыворотке крови комплексонометрическим методом с индикатором флуорексоном (по *Вичеву, Каракашеву*) 106
Определение кальция в костной ткани 108
Определение ионизированного кальция расчетным методом (по *Й. Тодорову*) 109
Определение ионизированного кальция с применением обменной адсорбции (по *Д. Т. Волкову*) 109
Определение неорганического фосфора в безбелковом фильтрате крови с ванадат-молибденовым реактивом *(по Полсу* в модификации *Коромыслова В. Ф.* и *Кудрявцевой Л. А.*) 109
Определение магния в сыворотке (плазме) крови по цветной реакции с титановым желтым (по *Кункелю, Пирсону, Швейгерту* в модификации *И. В. Петрухина*) 111
Определение калия и натрия в биологических жидкостях методом пламенной фотометрии 112
Методы исследования микроэлементов 115
Определение кобальта в крови по методу С. И. Гусевой в модификации А. А. Титовой 116
Определение йода, связанного с белком (СБЙ), в сыворотке крови по А. Кланду в модификации С. В. Силаевой 117
Определение марганца в крови периодатным методом 119
Определение меди и железа в крови по *Сенделу* в модификации С. Г. Кузнецовой 120

Определение церулоплазмы в сыворотке крови модифицированным методом Ревина 121
Определение цинка в крови с дитизоном по Н. А. Чеботаревой . . 122
Флуориметрический метод определения селена в почвах, кормах, крови и других биологических материалах с 2—3 диаминонафталином (ДАН) 124
Методы исследования витаминов 126
Определение витамина А в сыворотке крови по Бессею в модификации А. А Анисовой 126
Определение каротина в сыворотке (плазме) крови по Карр — Прайсу в модификации Юдкина 127
Флуориметрический метод определения общего тиамина в крови и печени (по Г. Д. Елисеевой) 128
Спектрофотометрическое определение токоферолов в плазме крови с α,α′-дипиридилом 130
Определение токоферолов в тканях и сыворотке крови методом колоночной хроматографии 131
Определение витамина С в плазме крови 133
Методы исследования активности ферментов 134
Определение активности аспартатаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы в сыворотке крови динитрофенилгидразиновым методом *(Райтман, Френкель)* 134
Определение активности лактатдегидрогеназы в сыворотке крови по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином (метод *Севела, Товарек)* 136
Определение активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови по гидролизу бета-глицерофосфата (метод *Бодански*) 138
Определение активности α-амилазы в сыворотке крови, моче и дуоденальном содержимом амилоклассическим методом по стойким крахмальным субстратам (метод *Карабея*) 139
Определение активности сорбитолдегидрогеназы в сыворотке крови по реакции с резорцином (метод *Севела, Товарек*) 140
Определение активности γ-утамилтранспептидазы в сыворотке крови с субстратом L—γ-глутамил-4-нитроанилидом 142
Определение активности фруктозы-1,6-дифосфатальдолазы в сыворотке крови (метод *В. И. Товарницкого, Е. Н. Волуйской* в модификации *В. А. Ананьева* и *В. Р. Обуховой*) 143
Определение активности холинэстеразы сыворотки крови колориметрическим методом 145
Определение активности холинэстеразы в сыворотке крови экспресс-методом с применением индикаторной бумаги 146
Определение нитратов и нитритов в кормах, воде и других биологических субстратах 147
Определение нитратов в кормах, крови, молоке и патологическом материале с использованием реактива Грисса 147
Определение нитритов в кормах, крови и патологическом материале с использованием реактива Грисса 149
Ионометрический экспресс-метод определения нитратного азота в почвах, кормах, природных водах и биологических субстратах . . 151

Методы исследования молока (молозива) *(Кондрахин И. П.)* . . . 156
Отбор проб молока (молозива) для анализа 156
Определение в молоке (молозиве) ацетоновых тел реактивом Лестраде 156
Определение в молоке (молозиве) кетоновых тел, общего кальция, неорганического фосфора, магния, мочевины, витамина А 157
Определение кислотности молока (молозива) по Тернеру 157

Методы исследования мочи *(Беляков И. М.)* 159
Получение и хранение мочи 159
Физико-химические свойства мочи 160
Определение реакции мочи (pH) 161
Методы обнаружения белка в моче 162
Определение белка в моче 162

Методы обнаружения сахара в моче 163
Обнаружение кетоновых (ацетоновых) тел в моче 165
Обнаружение желчных пигментов 165
Определение билирубина в моче по Йендрашеку—Грофу в модификации Вита 166
Обнаружение уробилиновых тел (уробилиногена и уробилина) в моче 167
Обнаружение крови и кровяных пигментов в моче 167
Определение общего азота мочи колориметрическим методом с реактивом Несслера 169
Определение аммиака в моче диффузионным методом (по Конвью-Байрну) 170
Определение 17-кетостероидов в моче (по Каен и Сальтеру) 171
Определение хлоридов в моче по Фольгарду 172
Определение кальция в моче 173
Морфология мочевых осадков 174

Методы исследования содержимого рубца *(Курилов Н. В., Севастьянова Н. А.)* 177
Взятие содержимого рубца и подготовка проб к анализу 177
Определение pH 178
Определение концентрации летучих жирных кислот в рубцовой жидкости и их хроматографический анализ 180
Определение общей концентрации летучих жирных кислот в рубцовой жидкости 181
Хроматографический анализ летучих жирных кислот 182
Определение молочной кислоты в рубцовой жидкости 185
Определение азотистых веществ в содержимом рубца 187
Определение аммиака (аммонийного азота) 188
Определение общего азота 189
Определение небелкового (остаточного) азота 190
Определение белкового азота 191
Определение нитратов и нитритов в рубцовой жидкости 191
Методы подсчета микроорганизмов в содержимом рубца 193
Определение количества инфузорий в содержимом рубца 194
Метод подсчета бактерий под микроскопом 195

Методы исследования желудочного содержимого *(Коробов А. В.)* . . . 197
Физиологические константы желудочного содержимого у животных . . . 197
Методы получения содержимого желудка, подготовка проб к анализу . . 198
Визуальная оценка содержимого желудка 200
Определение реакции желудочного содержимого 201
Определение общей кислотности, свободной и связанной соляной кислоты желудочного содержимого 202
Определение активности пепсина в желудочном содержимом 205
Определение уропепсиногена в моче (по *В. Н. Туголукову*) 207
Определение пепсиногена в крови (по *В. Н. Туголукову*) 208
Определение желчи и скрытой крови в содержимом желудка 209
Определение желудочного лейкопедеза 209

Специальные методы исследования новорожденных животных *(Блинов Н. И.)* 211
Определение иммунных белков сыворотки крови по реакции помутнения с сульфатом цинка (цинк-сульфатный тест — ЦСТ) 211
Определение фагоцитарной активности клеток крови по Кост и Стенко 212
Микрометод определения фагоцитарной активности клеток крови . . . 213
Методы выделения и идентификации Т- и В-лимфоцитов крови 215
Физиологические показатели крови и мочи у телят 222

Радиоиммунологические методы анализа гормонов *(Белов А. Д.)* . . . 227
Радиоиммунологическое определение трийодтиронина в крови 234
Радиоиммунологическое определение тиреокальцитонина в плазме крови 236
Определение паратгормона в крови 237
Определение инсулина 238
Определение кортизола 241

Радиоиммунологическое определение тестостерона 243
Определение гормонов гипофиза 245
Радиоиммунологическое определение окситоцина 245
Радиоиммунологическое определение кортикотропина в плазме крови животных (АКТГ) 246
Определение фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) 248
Определение лютенизирующего гормона (ЛГ) радиоиммунологическим методом 250
Радиоиммунологическое определение соматотропина (СТГ) в сыворотке крови крупного рогатого скота 251
Радиоиммунологическое определение пролактина крупного рогатого скота 252

Приложения 254

Указатель литературы *(источники)* 271
Предметный указатель 277

Иван Петрович Кондрахин,
Николай Васильевич Курилов,
Алексей Григорьевич Малахов и др.

КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА В ВЕТЕРИНАРИИ

Справочное издание

Заведующий редакцией *В. Г. Федотов*
Редактор *Н. И. Емельянова*
Художник *Н. Я. Назарова*
Художественный редактор *Н. А. Никонова*
Технические редакторы *В. И. Смирнова, Е. В. Соломович*
Корректоры *А. И. Болдуева, Э. О. Володкевич, Н. В. Рыбникова*

ИБ № 3519

Сдано в набор 17.04.84. Подписано к печати 14.12.84. Т-23725. Формат 60×90 1/16. Бумага тип. № 2. Гарнитура литературная. Печать высокая. Усл. печ. л. 18 + 4 цв. вкл. Усл. кр.-отт. 38. Уч.-изд. л. 29,33. Изд. № 287. Тираж 25 000 экз. Заказ № 337. Цена 1 р. 60 к.

Ордена Трудового Красного Знамени ВО «Агропромиздат»,
107807, ГСП, Москва, Б-53, ул. Садовая-Спасская, 18.

Ярославский полиграфкомбинат Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли. 150014, Ярославль, ул. Свободы, 97.