



В. С. Русак, І. В. Чала
Клінічна оцінка біохімічних, морфологічних показників крові та сечі тварин

В. С. Русак, І. В. Чала
Клінічна оцінка біохімічних, морфологічних показників крові та сечі тварин



В. С. Русак
І. В. Чала

**Клінічна оцінка
біохімічних, морфологічних
показників
крові та сечі тварин**

Навчальний посібник

ЖИТОМИР «ПОЛІССЯ» 2016

УДК 619
ББК 48
Р 88

*Друкується за рішенням вченої ради
Житомирського національного агроекологічного університету
від 25.05.2016 р., протокол № 9*

Рецензенти:

- О. Є. Галагюк** – доктор ветеринарних наук, професор кафедри мікробіології, вірусології та епізоотології ЖНАЕУ;
- Р. П. Параняк** – завідувач кафедри екології та біології Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С. З. Гжицького, доктор сільськогосподарських наук, професор;
- А. П. Стадниченко** – доктор біологічних наук, професор, академік АН ВШ України, заслужений працівник освіти, завідувач кафедри зоології, біомоніторингу та охорони природи ЖДУ ім. І. Франка.

Русак В. С., Чала І. В.
Р 88 Клінічна оцінка біохімічних, морфологічних показників крові та сечі тварин. Навчальний посібник. – Житомир: «Полісся», 2016. – 544 с.
ISBN 978-966-655-817-9

У посібнику наведені короткі відомості про хімічну будову, шляхи метаболізму найважливіших метаболітів організму тварин, що найчастіше використовуються у ветеринарній лабораторній діагностиці, методи їх дослідження. Розглядаються патології, фізіологічні зміни, за яких відбуваються зміни концентрації даних показників. Наведено набір найважливіших біохімічних тестів, які є індикаторними для окремих груп незаразних патологій тварин.

Посібник призначено для студентів факультетів ветеринарної медицини вищих навчальних закладів, спеціальності 211 «Ветеринарна медицина», ОКР «Магістр», практичних фахівців ветеринарної медицини, аспірантів.

**УДК 619
ББК 48**

ISBN 978-966-655-817-9

© В. С. Русак, І. В. Чала, 2016

ВСТУП

Стрімкий розвиток методів лабораторної діагностики у ветеринарній медицині, введення нових методик дослідження розширили перелік діагностичних тестів, які використовуються у практичній ветеринарній медицині, що, у свою чергу, збільшує можливості ветеринарного лікаря у постановці діагнозу, подальшій curaції пацієнта. Сучасна лабораторна техніка дозволяє не лише урізноманітнити перелік досліджуваних показників, але й збільшує роздільну здатність таких досліджень, разом з тим, інновації у сфері лабораторної діагностики вимагають дотримання певних процедур, поповнюють перелік факторів, що можуть впливати на результати досліджень. Розширення спектру біохімічних та морфологічних показників зумовлює необхідність їх інтерпретації для всебічної оцінки клінічного стану тварини, тому завданням даного посібника є розглянути клінічну оцінку біохімічних параметрів крові та сечі, що найчастіше використовуються у практичній ветеринарній діагностиці.

Оскільки посібник носить не лише навчальний характер, а й призначений для практикуючих лікарів ветеринарної медицини, автори вважали за доцільне ввести розділ: «Методи біохімічних досліджень», у якому проаналізовані сучасні методи лабораторних досліджень та їх можливості, що дозволить цілеспрямовано використовувати в оснащенні лабораторій ті чи інші методики, прилади, зокрема в останній час у мережах ветеринарних лабораторій широко використовують методи радіоімунного та ферментного аналізу, окремі мережі закордонних ветеринарних клінік вводять у так зване широке застосування методи, пов'язані з аналізом структури нуклеїнових кислот, тому, як студентам, так і практикуючим лікарям, важливо знати принципи та можливості таких інноваційних технологій.

Іншим важливим розділом є «Артефакти біохімічних досліджень», у якому висвітлені найбільш поширені похибки, що можуть виникати на різних етапах лабораторних досліджень, починаючи від моменту відбору біосубстратів і закінчуючи інтер-

претацією одержаних результатів. Вказаний розділ має на меті застерегти від генеалізованого підходу до вибору біохімічного показника та його оцінки, виключити фактори, що можуть спотворити той чи інший одержаний результат. Особлива увага спрямована на зміни певних біохімічних чи морфологічних показників у залежності від медикаментозного впливу – досить часто ветеринарний лікар, призначаючи певний обсяг досліджень, не враховує введення лікарських препаратів, домішок до раціону або маніпуляцій, що проводились з твариною на етапі долікарняної допомоги, і, як наслідок, результати лабораторних досліджень трактуються не зовсім правильно або маскуються істинні причини змін того чи іншого показника.

Найширше і найповніше представлена інтерпретація показників крові, що характеризують різні ланки обміну речовин, опис кожного показника супроводжується його клінічною характеристикою, патологіями або фізіологічними змінами, що зумовлюють його відхилення від референсних значень. Однією з проблем, з якими стикаються молоді лікарі ветеринарної медицини та науковці, є вибір біохімічних, морфологічних показників, які б найповніше характеризували зміни, що виникають за певних патологічних станів, тому окремий розділ присвячено біохімічним та морфологічним змінам у крові та сечі, що є індикаторними для окремих патологій, це дозволить цілеспрямовано відслідковувати найхарактерніші зміни, що лежать в основі патологічних процесів.

Посібник призначений для студентів, що вивчають ветеринарну медицину та спеціалізуються на лабораторній діагностиці, практичних лікарів ветеринарної медицини.

Автори висловлюють щиру вдячність колегам, усім, хто долучився до підготовки даного посібника.

Список скорочень

АІ – аніонний інтервал;
АЛТ, АлаТ – аланін амінотрансфераза;
АМГ – α_2 -макроглобулін;
АПТЧ – активований парціальний тромбoplastичний час;
АСТ, АсАТ – аспарагін амінотрансфераза;
АТ III – антитромбін III;
АФС – антифосфоліпідний синдром;
АХЕ – ацетилхолінестераза;
БГФ – білки гострої фази;
ГГТ – гама-глутамілтрансфераза;
ГДГ – глутаматдегідрогеназа;
ДВЗ – дисеміноване внутрішньосудинне згортання крові;
ЗЗЗС – залізовв'язуюча здатність сироватки;
ІФА – імуноферментний аналіз;
КК – креатинкіназа;
КР – каналцева реабсорбція;
КФК – креатинфосфокіназа;
ЛДГ – лактатдегідрогеназа;
Лп – ліпаза;
ЛП – ліпопротеїди;
ЛПВГ – ліпопротеїди високої густини;
ЛПДНГ – ліпопротеїди дуже низької густини;
ЛПНГ – ліпопротеїди низької густини;
ЛФ – лужна фосфатаза;
МНВ – міжнародне нормалізоване відношення;
НАД – нікотинаміддинуклеотид;
НЕЖК – неестерифіковані (неестерифіковані) жирні кислоти;
ПВ – протромбінові відношення;
ПЛР (PCR) – полімеразна ланцюгова реакція;
ПТГ – паратиреоїдний гормон;
ПТІ – протромбіновий індекс;
ПЧ – протромбіновий час;
РФМК – розчинні фібрин-мономерні комплекси;
САА – сироватковий амілоїд А;
СДГ – сорбітолдегідрогеназа;
СРБ – С – реактивний білок;

ТАП – тканинний фактор плазміногену;
ТЧ – тромбіновий час;
ФАД – флавінаденідинуклеотид;
ХЕ – холінестераза;
ХМ – хіломікрони;
ШКФ – швидкість клубочкової фільтрації нирок;
Hct – гематокрит;
Hgb – гемоглобін;
MCH – середній вміст гемоглобіну в еритроциті;
MCHC – середня концентрація гемоглобіну в еритроциті;
MCV – середній об'єм еритроциту;
PLT – кількість тромбоцитів;
RBC – кількість еритроцитів;
RDV – показник анізоцитозу еритроцитів;
WBC – кількість лейкоцитів.

Розділ 1

КРОВ ЯК ОБ'ЄКТ ДОСЛІДЖЕНЬ

Кров – специфічна сполучна тканина хребетних тварин, яка виконує ряд життєво важливих функцій, зокрема, інтегрування окремих органів та тканин в єдине ціле. Завдяки тому, що кров, як внутрішнє середовище, містить групу хімічних систем, які регулюють і підтримують на постійному рівні ряд параметрів (онкотичний тиск, кислотно-лужну рівновагу, рівень глюкози, білків, вміст Кальцію, Фосфору тощо), виконує транспортну, синтетичну, газообмінну та інші функції, вона є найбільш важливим об'єктом для біохімічних, цитологічних, серологічних досліджень. Для більш детальної оцінки клінічного стану тварин використовують інші біологічні субстрати, наприклад: сечу, молоко, лімфу, шлунковий та кишковий сік, біоптати тканин тощо. Однак, за всієї важливості наведених біосубстратів, дослідження крові посідає центральне місце у практичній лабораторній діагностиці.

Для біохімічних та цитологічних досліджень найчастіше використовують венозну кров, однак для деяких досліджень використовують артеріальну кров, зокрема при визначенні парціального тиску газів (O_2 та CO_2). Окрім вмісту газів, у артеріальній та венозній крові можуть спостерігатись незначні коливання у вмісті деяких інших метаболітів. Для уніфікації даних та можливості порівняння з нормативними показниками за основу взяті дослідження венозної крові. Склад крові представлений на схемі (рис 1.1).

Цільна (нативна, «жива») кров містить клітини крові та міжклітинну рідину, яку називають **плазмою**. Цільна кров має здатність коагулювати, у результаті чого розчинний білок **фібриноген** перетворюється на нерозчинний **фібрин**, який утворює волокна, що оточують формені елементи крові (рис. 1.2).



Рис. 1.1. Склад крові хребтних тварин

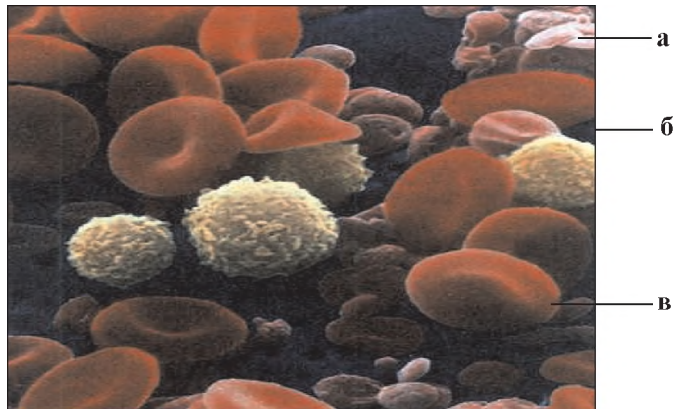


Рис. 1.2. Формені елементи крові:
а – еритроцити, *б* – лейкоцити,
в – тромбоцити

Коагуляція (згортання) крові – це багатоступеневий складний процес, механізм якого буде розглядатись в окремому розділі. Коагуляція приводить до утворення згустку, який за допомогою фібринових волокон прикріплюється до стінок судин *in vivo* або до стінок пробірки *in vitro*.

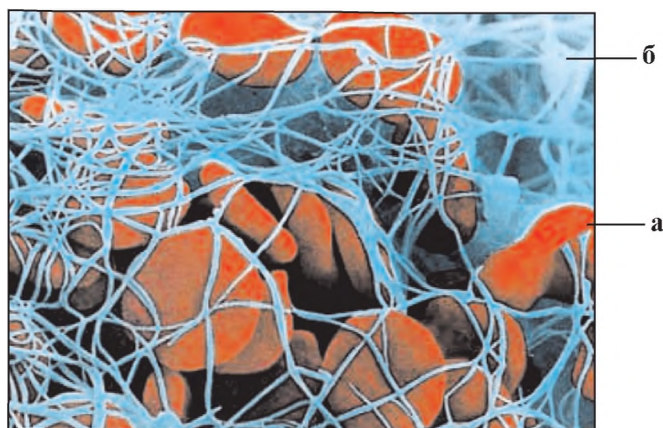


Рис. 1.3. Коагуляція крові: *а* – еритроцити, *б* – волокна фібрину

Через певний час відбувається ущільнення (ретракція) згустка, у результаті чого виділяється **сироватка**, яка, на відміну від плазми, не містить фібриногену. За біохімічним складом сироватка і плазма крові подібні (якщо не враховувати наявність фібриногену, певні відмінності у газовому складі та деякі інші показники). Сироватка та плазма містять білки, вуглеводи, ліпіди, які містяться переважно у сполуках з білками – ліпопротеїдами, деякі фракції ліпідів перебувають у вільному стані, також містяться безбілкові азотисті речовини, вітаміни, мінерали, гормони. Для біохімічних досліджень використовують як плазму, так і сироватку крові, і хоча вони мають подібний біохімічний склад, у ряді випадків використовують вибірково той чи інший біосубстрат. Наприклад, для визначення лужного резерву крові використовують плазму крові. Це пов'язане з тим, що для одержання сироватки (для проходження коагуляції) необхідно відстоювати кров певний час, причому, необхідно забезпечи-

ти доступ повітря, однак кров за рахунок слаболужної реакції середовища досить добре поглинає вуглекислий газ, що може суттєво впливати на вміст бікарбонатів. Аналогічні процеси мають місце при визначенні вмісту імуноглобулінів крові цинк-сульфатним методом. В основі даного методу лежить визначення ступеня помутніння, утворення якого також залежить від наявності вуглекислоти, тому у цьому випадку бажано використовувати плазму крові, причому, зберігати кров слід у герметичних умовах (про це, а також про інші артефакти при проведенні біохімічних досліджень детальніше у розділі 3).

При виборі матеріалу досліджень слід також пам'ятати, що деякі сполуки мають досить короткий період напіврозпаду або втрачають активність при зберіганні, тому час, необхідний для отримання сироватки крові, вільний доступ кисню, вуглекислого газу можуть суттєво змінити як кількісні, так і якісні параметри, а отже, слід чітко дотримуватись методики дослідження і використовувати уніфіковані методи досліджень або проводити їх за допомогою біохімічних аналізаторів.

Щоб одержати цільну (нативну) кров, необхідно її стабілізувати. Для стабілізації використовуються сполуки, які здатні зв'язувати іони кальцію (цитрат натрію, оксалат натрію, трілон Б (ЕДТА – етилендіамінтетрацетондинатрієва сіль) або інгібувати ферменти згортання крові (фторид натрію), або природним шляхом гальмувати перетворення фібриногену у фібрин (гепарин).

У залежності від мети досліджень використовують той чи інший антикоагулянт. Так, за використання цитрату натрію, фториду натрію, оксалату натрію може спостерігатись незначне порушення осмотичної рівноваги, що призводить до втрати еритроцитами Калію, води, тому наведені антикоагулянти не бажано використовувати при дослідженні морфометричних показників крові (середнього об'єму еритроцитів), при визначенні ШОЕ (вважається, що солі Натрію можуть змінювати перерозподіл електричних зарядів на поверхні еритроцитів, а отже, змінювати їх седиментаційну здатність). Солі Натрію також не рекомендується застосовувати у якості антикоагулянтів для визначення вмісту Калію, Натрію, осмотичності, осмотичного проміжку, аніонного промі-

жку, – у цих випадках бажано використовувати природний антикоагулянт гепарин. У випадку, якщо метою досліджень є визначення вмісту глюкози, глікопротеїдів або гліколіпідів, застосування гепарину може призвести до збільшення вмісту глюкози, оскільки гепарин за хімічною будовою належить до глікозаміногліканів, при гідролізі розпадається на глюкуронову кислоту та похідне глюкозаміну, що є похідними глюкози, однак ці зміни є несуттєвими. Не бажано використовувати для дослідження вуглеводного обміну і солі цитринової кислоти (цитрат натрію), найкраще використовувати фторид натрію.

Застосування гепарину як антикоагулянта

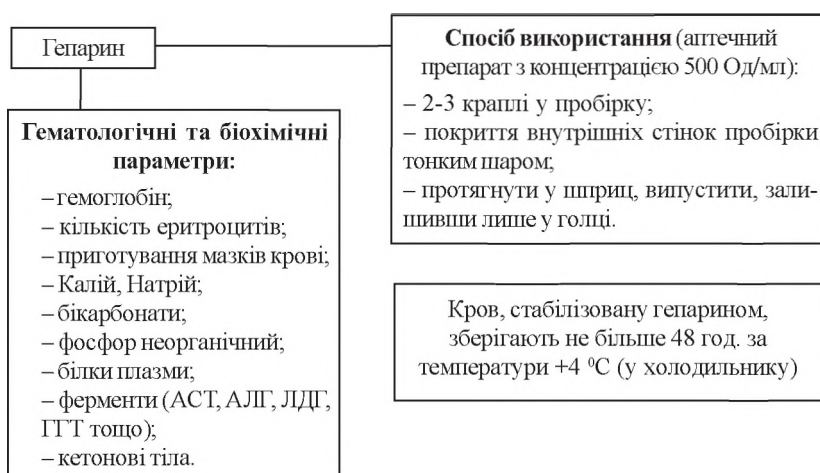


Рис. 1.4. Застосування гепарину у якості антикоагулянту

Кров, що стабілізують фторидом натрію, не бажано використовувати для визначення активності ферментів (переважно тих, що належать до класу оксидоредуктаз), слід пам'ятати, що дана сполука є інгібітором мітохондріальних ферментів. Найкраще фторид натрію застосовувати для визначення концентрації глюкози, він зменшує інтенсивність окиснення останньої.

Біохімічні та цитологічні дослідження крові слід проводити відразу після відбору; якщо є необхідність у одночасному визначенні багатьох параметрів і обробці значної кількості зразків або їх транспортуванні, то цільну (стабілізовану антикоагулянтном) кров слід зберігати у холодильнику, не допускаючи контакту з повітрям та заморожування; якщо використовується плазма, то її необхідно відділити від формених елементів відразу після відбору, це зменшить перехід продуктів можливого гемолізу у плазму. За необхідності одержання сироватки з метою скорочення часу формування згустка бажано інкубувати кров у термостаті за температури 37 °С. Сироватку та плазму крові можна заморожувати, причому, слід пам'ятати, що розморожувати можна лише один раз.

Таким чином, дотримання умов відбору, стабілізації, зберігання зразків крові дозволяє провести повноцінні біохімічні дослідження та одержати коректні результати.

Питання для самоконтролю

1. Які біологічні функції виконує кров?
2. Які формені елементи входять до складу крові, укажіть особливості будови та функцій формених елементів крові.
3. Як одержати сироватку та плазму крові, які зміни хімічного складу можуть виникати за недотримання умов відбору та зберігання цільної крові, сироватки та плазми?
4. За якими біохімічними показниками відрізняється сироватка крові від плазми?
5. Які антикоагулянти використовують для одержання цільної крові, за яких умов використання гепарину, цитрату натрію, фториду натрію. ЕДТА може впливати на визначення біохімічних параметрів крові і чому?
6. Які зміни відбуваються з компонентами плазми чи сироватки при заморожуванні–розморожуванні і як вони впливають на результати досліджень?

Розділ 2

МЕТОДИ БІОХІМІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Однією з важливих проблем біохімічних та цитологічних досліджень є уніфікація методик, стандартизація приладів, точність у приготуванні реактивів тощо.

У клінічній лабораторній практиці використовують ряд методик, в основі яких лежать фізичні, хімічні та біохімічні процеси.

В основі фізико-хімічних методів досліджень лежать фізичні явища: сорбція, седиментація, оптичні явища тощо.

Фізико-хімічні методи:

- електрохімічні;
- спектральні;
- хроматографія;
- мас-спектрометрія;
- радіометрія.

До електрохімічних методів належать: електрогравіметричний, кондуктометричний, потенціометричний, вальтоперометрія, кулонометрія.

Потенціометрія – це вимірювання різниці потенціалів за допомогою спеціальних електродів. Найчастіше цей метод використовують для визначення концентрації деяких іонів: протону Гідрогену (H^+) (величина рН), нітрит-іону (NO_2^-) тощо.



Рис. 2.1. Сучасний іонімір, що дозволяє шляхом зміни індикаторного електрода визначати рН, концентрацію нітритів та нітратів тощо

Серед електрохімічних методів набули широкого застосування і вважаються класичними методи *електрофорезу*, що ґрунтуються на різній рухливості молекул у електричному полі. Найчастіше електрофорез використовують для розділення на фракції білків, фрагментів нуклеїнових кислот, інших сполук, молекули яких несуть електричні заряди. Змінюючи фізико-хімічні характеристики середовища, у якому відбувається електрофорез, силу струму, можна одержати як фракції (групи) сполук, близьких за фізико-хімічними властивостями, так і окремі сполуки (рис. 2.2).



Рис. 2.2. Електрофоретичне розділення білків: на фотографії видно окремі полоски, за товщиною яких можна визначити концентрацію кожної фракції, для ідентифікації паралельно із зразком, що досліджується, можуть проводити електрофорез конкретних білків, які є маркерами

Сучасні біохімічні лабораторії оснащені новітніми пристроями, які включають не лише апаратуру, призначену для проведення електрофо-

резу, а й прилади, необхідні для «прочитання» електрофореграм, їх математичної обробки тощо (рис 2.3).



Рис. 2.3. Пристрій для проведення електрофорезу та обробки даних

Значного поширення у біохімії набули спектральні методи. В основі вказаних методів лежить взаємодія досліджуваної речовини з електромагнітним випромінюванням. У залежності від частотності (або довжини хвилі) це можуть бути видимі світлові промені, ультрафіолетові, інфрачервоні, рентгенівські, γ -промені. Різноманітність спектральних досліджень настільки широка, що дає можливість визначити значну кількість параметрів від концентрації речовини до просторової будови (рис. 2.4.)

Молекулярно-абсорбційний спектральний аналіз ґрунтується на здатності різних речовин поглинати різну кількість енергії у залежності від концентрації. Використовують прилади з фіксованою довжиною світла – фотоелектрокалориметри (ФЕК), які проводять вимірювання у видимій (330–750 нм) частині спектру, поряд з цим існують прилади, де можна визначити інтенсивність оптичної абсорбції при заданій довжині хвилі – спектрофотометри. Більшість сучасних спектро-



Рис. 2.4. Різноманітність спектральних методів

фотометрів дозволяють проводити дослідження не лише у видимій, а і в ультрафіолетовій зоні спектру.

Молекулярно-абсорбційним методом визначають цілий ряд найбільш клінічно значимих параметрів крові: вміст загального білка, глюкози, кальцію, фосфору, холестерину, активність ферментів.

Атомно-емісійний метод (метод атомної абсорбції). Суть даного методу полягає у випромінюванні певного спектру хвиль збудженого атома або іона. Збудження відбувається при нагріванні у полум'ї, електричній дузі, іскрі. Різновидами даного методу є полум'яна фотометрія, за допомогою якої визначають концентрацію у крові Калію та Натрію. Використовуючи ще один метод – ІЗП (індуктивно-зв'язана плазма), можна визначити концентрацію багатьох хімічних елементів, однак вказаний метод вимагає високих енергетичних затрат.

Атомно-абсорбційний аналіз використовують для визначення концентрації макро- та мікроелементів включно з важкими металами.

Атомно-емісійний метод набув широкого застосування у клінічній лабораторній діагностиці при дослідженні мінерального обміну, у ветеринарно-санітарній експертизі при дослідженні якості продукції та в екології (визначення концентрації важких металів).



Рис. 2.4. Атомно-сорбційний спектрометр з полум'яною атомізацією

Інфрачервона (ІЧ) спектроскопія. В основі цього методу лежить індивідуальна здатність змінювати спектр ІЧ випромінювання окремими хімічними групами та зв'язками. Це дає можливість не лише встановити просторову будову тієї чи іншої речовини, але й прослідкувати конформаційні зміни впродовж хімічної реакції, тому ІЧ-аналіз використовують у хімічній кінетиці.

Флуоресцентна спектрометрія. Цілий ряд органічних речовин мають здатність, поглинаючи світлову енергію, частково її випромінювати, але з іншою частотою. Це явище називається люмінесценція, а речовини, що володіють такою здатністю, – хромофори. До хромофорів належать ретинол (вітамін А), порфірини (складові частини гемму), деякі антибіотики та барвники. Флуоресцентний метод корисний при дослідженні мембран та процесів, що відбуваються навколо них, для цього у культуральне середовище клітини вводять флуоресцентний маркер (мітку), який реагує на молекулярному рівні, причому чутливість настільки висока, що фіксуються хімічні зміни, які тривають дуже короткий проміжок часу (10⁻⁹–10⁻¹² с). Інтенсивність флуоресценції фіксують за допомогою приладів – спектрофлуориметрів.

Радіоспектроскопічні методи аналізу в своїй основі мають дію електромагнітного випромінювання в зоні високочастотних коливань (106–109 Гц, радіочастоти). До цієї групи досліджень належать **електронний парамагнітний резонанс (ЕПР)** та **ядерно-магнітний резонанс (ЯМР)**.



Рис. 2.5. Спектрометр ядерного парамагнітного резонансу

Електронний парамагнітний резонанс ґрунтується на здатності неспарених електронів у потужному магнітному полі змінювати спін і поглинати енергію. За звичайних умов спіни неспарених електронів є випадковими. У магнітному полі спіни упорядковуються у двох напрямках: і за напрямком магнітного поля, і проти напрямку. Причому, неспарені електрони нижчих енергетичних рівнів, поглинаючи енергію, що створює магнітне поле, переходять на вищий енергетичний рівень. Поглинання енергії (яка є індивідуальною для кожного хімічного елемента) змінює спектр випромінювання, що свідчить про зміни у атомній будові. Найширшого застосування набула ця методика для аналізу сполук, що містять метали. За допомогою цієї методики були дослідженні металопротейди, флавоноїди. Оскільки більшість органічних сполук не містять неспарених електронів, то до таких сполук вводять молекулярний зонд. Завданням дослідника є, по-перше, підібрати ра-

дикал таким чином, щоб він не чинив впливу на біологічні властивості речовин, по-друге, розташовувати його таким чином, щоб він знаходився в епіцентрі можливих змін.

Ядерно-магнітний резонанс полягає у збудженні ядер сильним магнітним полем. У результаті зміни орієнтації магнітного поля виникає резонанс ядер. Застосування ЯМР дає можливість визначити структуру органічних речовин, просторове розташування хімічних груп, радикалів, наприклад: трансізомерні форми ненасичених жирних кислот, таутомерні форми вуглеводів; окрім якісного аналізу, дані методики дозволяють зробити кількісний аналіз. Для біохімічних досліджень використовують протонний магнітний резонанс (сигнали від ядер Гідрогену ^1H), вуглецевий магнітний резонанс (сигнали ядер Карбону ^{13}C). Слід зазначити, що ^{13}C ЯМР має значне поширення, оскільки ядра Карбону, що входять до різних хімічних груп або різних типів хімічних зв'язків, мають різні лінії спектру, що дозволяє відслідковувати зміни у конформації білків, і особливо ферментів, ліпопротеїдні зв'язки у клітинних мембранах. Ще одним хімічним елементом, ЯМР якого досить часто використовують у біохімічних дослідженнях, є Фосфор (^{31}P). Як відомо, значна частина сполук є макроергами і беруть участь у енергетичному обміні, зокрема в окислювальному фосфорилуванні. До групи фосфоромісних сполук належать АТФ, УТФ, ГТФ та їх похідні: гліцерофосфат, креатин фосфат, фосфоенолпіруват, фосфатиди. Окремо слід зазначити про роль ^{31}P ЯМР у дослідженнях нуклеїнових кислот, їх конформаційних змін при реплікації, транскрипції, різноманітних мутаціях.

Таким чином, ЯМР є надзвичайно ефективним методом досліджень.

Сорбційні методи досліджень. Сорбція лежить в основі такого методу, як хроматографія. Хроматографія – це метод розділення та ідентифікації індивідуальних речовин, що ґрунтується на різній інтенсивності сорбції. У залежності від будови сорбента, його фізико-хімічних властивостей, які у деяких методиках можна задавати на стадії виготовлення, речовини по-різному сорбуються, проходячи з розчинною фазою певну відстань. *Відношення відстані, яку пройшла речовина,*

до загальної відстані, яку пройшов розчин, називають *рухливістю речовини*.

Рухливість речовини є індивідуальною характеристикою для кожної з речовин при хроматографії та електрофорезі, окрім того, вона є кількісною характеристикою. Щоб оцінити кількість речовини, яка утворює полоси певної товщини або насиченості, використовують спектральні методи (спеціальні прилади денситометри) або колориметричні. У залежності від носія, на якому розташовують сорбент, хроматографія поділяється на площинну і колонкову.

При **площинній хроматографії** сорбентом може бути *хроматографічний папір або скло*, на яке нанесений сорбент.

При певних методах досліджень використовують двовірну хроматографію, яку проводять у перпендикулярних напрямках для збільшення роздільної здатності. До площинної хроматографії належить тонкошарова хроматографія, при якій на плоский носій наносять сорбент.

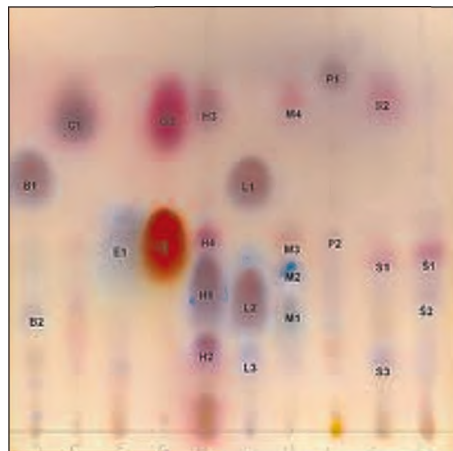


Рис. 2.6. Розділення білків методом тонкошарової хроматографії

Колонкова хроматографія проводиться шляхом пропускання зразка через сорбент, який поміщають у трубку (колонку). Колонкову хроматографію класифікують у залежності від механізмів взаємодії між

сорбентом та сорбатом (речовина, що досліджується). До колонкової хроматографії належать абсорбційна, гель-фільтраційна, іоно-обмінна, афінна, газова.

Адсорбційна хроматографія ґрунтується на законах сорбції. Сорбентами можуть бути сполуки Алюмінію та Кремнію.

Гель-фільтраційна хроматографія. У якості сорбентів при цій хроматографії використовують структуровані дисперсні системи – гелі. При приготуванні гелів задаються розміри та форма пор, величина зерен гелю, у колонку вносять шарами різні види гелів, що дозволяє розділити речовини на окремі класи або індивідуальні речовини.

Центрифугування. Це метод розділення сумішей під дією відцентрових сил. Якщо питома маса частинок у розчині більша, ніж питома маса розчину, то відбувається *седиментація* – осадження, якщо питома маса частинок менша, то відбувається *флотація* – спливання на поверхню розчину. Якщо частинки мають близькі питомі маси, то вони можуть бути розділені у центрифугах, що мають відцентрову силу, яка у багато разів перевищує силу земного тяжіння. Відцентрову силу характеризують прискоренням вільного падіння g ($g = 9,81 \text{ м/с}^2$). Так, величини до 10000 g дають звичайні центрифуги, ультрацентрифуги дають прискорення 500000 g і вимагають охолодження та вакууму для зменшення тертя.

Кожна частинка характеризується здатністю до осідання, яка залежить від молекулярної маси, форми, питомого об'єму і називається *коефіцієнтом седиментації* S і виражається в одиницях Сведберга ($1S = 10^{-13} \text{ с}$). При дослідженні макромолекул, або органел, використовують центрифугування у *градієнті щільності* (найчастіше за основу використовують розчин хлориду Цезію). Існує дві різновидності даного методу: зональне та ізопікнічне центрифугування. При *зональному* центрифугуванні центрифужну пробірку заповнюють буферним розчином, концентрація якого зростає від поверхні до дна пробірки, для стабілізації градієнту використовують вуглеводи або сілікагелі. Досліджувану речовину наносять на поверхню розчину, під час центрифугування досліджувана речовина перерозподіляється на зони, дно пробір-

ки проколюють і виділяють окремі речовини. При *ізоікнічному* центрифугуванні досліджувану речовину рівномірно розподіляють, у результаті центрифугування кожна речовина зосереджується у так званій зоні «плаваючої щільності», що є характерною для кожної окремої речовини, найчастіше цим методом розділяють нуклеїнові кислоти та віруси.

Радіоімунні методи дослідження (РІА). Дана назва об'єднує методи кількісного визначення біологічно активних речовин, як то: гормони, ферменти, окремі макромолекули у біологічних рідинах. Метод ґрунтується на конкурентному зв'язуванні речовини, що досліджується і є стабільною, та синтетичного аналогу, який несе радіоактивну мітку із специфічним антитілом. Чим більша концентрація досліджуваної речовини і, головне, її біологічна активність, тим більше вона буде витісняти синтетичний радіоактивний аналог. Кількість останнього визначають за рахунок радіоактивної мітки.

Для проведення РІА існують стандартні набори реагентів, призначені для визначення конкретної речовини, дослідження проводяться *in vitro*, тому не вимагають введення радіоактивної мітки в організм тварини. Дослідження проводять у декілька етапів: спочатку змішують біологічний матеріал з реагентом, інкубують суміш упродовж декількох годин, розділяють вільну і зв'язану форми радіоактивної речовини, здійснюють радіометрію проби, розраховують результати. Метод вирізняється високою чутливістю, його можна використовувати у діагностиці захворювань серцево-судинної, ендокринної, імунної систем, у онкології – для визначення маркерів пухлин, особливо цінним даний метод у ветеринарії є при патологіях репродуктивної системи, але проблема полягає у тому, що стандартні набори призначені для визначення біологічно активних речовин людини, тоді як ферменти і гормони мають видову специфічність.

Імуноферментний аналіз (ІФА). Цей вид досліджень поєднує у собі біохімічні та імунологічні методи і ґрунтується на високій вибірковості і специфічності імунологічних реакцій «антиген – антитіло». Найбільшого поширення набув твердофазний гетерогенний імуний аналіз – ELISA (enzyme linked immunosorbent assay). Застосовують ІФА у двох

напрямок: для визначення антигенів – збудників інфекційних захворювань, але частіше цей метод використовують для визначення класів імуноглобулінів IgA, IgM, IgG. За допомогою ІФА можна визначити антитіла до будь-кої інфекції (якщо вони продукуються в організмі).

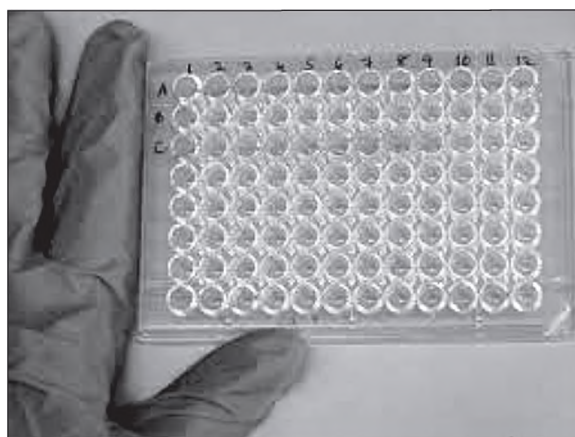


Рис. 2.8. Планшет з лунками для проведення імуноферментного аналізу

В основі ІФА лежить імунна реакція антигену з антитілом, причому до антитіла приєднують ферментну мітку. Зміну ферментативної активності визначають звичайними біохімічними методами (використовують спектральні методи). Перед початком досліджень на поверхні лунок імунологічного планшету фіксують антигени збудника, вносять біологічний матеріал, і, за наявності імуноглобулінів, у цьому матеріалі відбувається перша реакція преципітації. Для виявлення комплексів, що утворилися, проводять другу імунологічну реакцію, у якій у якості антигену використовують специфічні імуноглобуліни, що зв'язалися, а у якості антитіл – комплекс (кон'югат) між імуноглобуліном та ферментом – пероксидазою. Далі відбувається ферментна реакція, субстратом у якій є специфічна речовина (хромоген), яка вноситься у вигляді лейкоформи (безбарвна). При дії ферменту субстрат перетворюється у забарвлену сполуку. Інтенсивність забарвлення у лунці свідчить про

концентрацію імуноглобулінів. Відсутність забарвлення свідчить про відсутність антитіл до даного збудника. По закінченні реакцій проби фотометрують, щоб визначити інтенсивність забарвлення.

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР, PCR, ДНК-аналіз).

Один з найсучасніших методів дослідження, що дозволяє діагностувати інфекційні захворювання, характеризується високою точністю, швидкістю і мінімальною кількістю біологічного матеріалу. Метод ПЛР був відкритий у 1983 році американським ученим Керрі Мулісом, перша публікація про цей метод з'явилась у 1985 році у журналі «Science». Суть цього методу полягає у тому, що на основі молекули ДНК будуються нові копії, які порівнюються з іншою ДНК (наприклад, збудника захворювання). Дослідження проводиться у декілька етапів. Перший етап носить назву «денатурація» і полягає у тому, що дволанцюгову ДНК – матрицю, яка міститься у біологічному матеріалі, нагрівають до 94–96 °С упродовж 0,5–2 хвилин, за цих умов ланцюги ДНК розходяться – відбувається денатурація. На цій стадії до суміші додають невеликі парні нуклеотидні сполуки – *праймери*. Досить часто проводять додаткове нагрівання для того, щоб відбулася повна денатурація не лише матриці ДНК, а і самих праймерів. Такий методичний прийом називають «гарячим стартом», він дозволяє зменшити кількість неспецифічних продуктів реакції і збільшити точність.

На другому етапі, який називають «відпалом», температуру знижують, щоб праймери могли зв'язатися з одностанцюговою ДНК, – ця стадія триває також близько 2 хвилин.

На третьому етапі до суміші додають фермент ДНК-полімерази, яка, використовуючи праймер як заправку, починає синтезувати нуклеотидний ланцюг, комплементарний ланцюгу ДНК-матриці. Цей процес називають *елонгацією* (подовженням), хоча насправді подовжується лише один з ланцюгів. Елонгація може включати декілька циклів, у результаті чого спостерігається збільшення копій ДНК, цей процес називають «ампліфікацією».

Метод ПЛР у гуманній медицині набув широкого поширення, його використання не обмежується виявленням збудників захворювань, він

також використовується у криміналістиці, встановленні батьківства тощо. Щодо ветеринарної медицини, то даний метод поступово виходить за межі клінічної діагностики, він поширюється у царині ветеринарно-санітарної експертизи, дає можливість визначити походження сировини, виявити генетично-модифіковані організми. Різновидами методу ПЛР є: «Інвертована ПЛР» (*Inverse PCR*), ПЛР зі зворотною транскрипцією (*Reverse Transcription PCR, RT – PCR*), асиметрична ПЛР (*Asymmetric PCR*), кількісна ПЛР (*Quantitative PCR, Q – PCR*), кількісна ПЛР у реальному часі (*Quantitative real – time PCR, Touchdown (Stepdown) ПЛР (Touchdown PCR)*), метод молекулярних колоній або ПЛР у гелі (*Colony – PCR*), ПЛР зі швидкою ампліфікацією кінців кДНК (*Rapid amplification of cDNA ends, RACE – PCR*), ПЛР довгих фрагментів (*Long – range PCR*).

Таким чином, значна різноманітність застосування інноваційних технологій, використання високочутливих методів досліджень дозволяють проводити лабораторні дослідження у ветеринарії з високою точністю, забезпечують зменшення похибок при проведенні досліджень.

Питання для самоконтролю

1. Які фізико-хімічні методи використовуються у біохімічних дослідженнях?
2. На основі яких фізико-хімічних закономірностей ґрунтуються одні з найпоширеніших біохімічних методів досліджень електрофорез та хроматографія? Охарактеризуйте різновиди вказаних методів і укажіть можливі похибки, що можуть виникати за їх застосування.
3. Що таке седиментаційні методи досліджень, сфера їх застосування.
4. На яких біохімічних реакціях ґрунтуються радіоімунологічні методи дослідження, які закономірності, що лежать в основі РІА, дозволяють виділити активні форми гормонів, ферментів тощо?
5. Що таке імуноферментний метод досліджень, які методи він поєднує, у яких галузях ветеринарної лабораторної діагностики він використовується?
6. Які етапи включає метод полімеразної ланцюгової реакції, поясніть значення понять «праймер», «відпал», «елонгація», «ампліфікація»?
7. У яких галузях ветеринарної медицини використовують метод ПЛР?

Розділ 3

АРТЕФАКТИ БІОХІМІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Для оцінки клінічного стану при проведенні біохімічних досліджень важливою проблемою є так звані артефакти, або хибні результати. Поява артефактів може мати місце на всіх етапах досліджень, починаючи з огляду тварини та відбору зразків біологічних рідин і закінчуючи інтерпретацією одержаних результатів.

Похибки лабораторних досліджень умовно поділяють на три види: *випадкові, систематичні та грубі*.

Випадкові – це похибки, що виникають без будь-якої закономірності, не підлягають визначенню як за величиною, так і за напрямком, вони проявляються у відмінностях при обробці одного зразка з використанням певної методики.

Основними причинами випадкових похибок є:

- гетерогенність зразка, взятого для аналізу (нерівномірність розподілу компонентів), щоб уникнути даних похибок, достатньо ретельно перемішати або провести додаткову гомогенізацію;
- певні відхилення точності вимірювального посуду, приладів;
- слід дотримуватись головного правила проведення лабораторних досліджень: набір посуду та прилади постійні для визначення певного показника, калібрувальні графіки будуються для конкретного вимірювального приладу, при заміні приладдя слід провести серію досліджень зі стандартними зразками;
- «суб'єктивний фактор», який залежить від кваліфікації та досвіду персоналу, втома персоналу, психологічна компонента тощо;
- хімічна чистота посуду, реактивів, ступінь дистиляції води.

Для запобігання випадковим похибкам, необхідно проводити визначення кожного показника у двох (а в ідеалі – у трьох) повторях або провести послідовний відбір та обробку двох зразків у однієї і тієї ж тварини.

До *систематичних похибок* відносять відхилення, які мають певну причину і є однонаправленими (дають серію завищених або занижених результатів). Причини таких похибок кваліфіковані лікарі та лаборанти виявляють відносно легко і усувають, а якщо це неможливо, то вводять поправочні коефіцієнти. Слід зазначити, що у цьому випадку лаборант, який проводив дослідження, повинен бути впевнений у правильності розрахунку даного коефіцієнту і обов'язково вказати про введення такого коефіцієнту.

Причини систематичних похибок:

- методичні похибки, що залежать від роздільної здатності методики визначення, це одна з найвагомійших причин, якої досить важко позбутись;
- помилки, що залежать від точності приладів, наявності забруднювачів у реактивах, повітрі;
- оперативні похибки, викликані неточним виконанням операцій, дотриманням методики, наприклад, занижена або завищена температура при визначенні вмісту загального білка рефрактометричним методом, порушення часу фарбування зразків тощо;
- індивідуальні похибки, що залежать від особистих навичок лаборанта, гостроти сприйняття (наприклад, зміна кольору при титруванні) тощо.

Систематичні похибки впливають на всю серію досліджень, однак вони часто нівелюються за рахунок аналогічних змін у контрольному зразку. Якщо методика передбачає приготування контрольного зразка, то поява відхилень буде виявлена при обробці саме цього зразка.

Грубими похибками називають такі одиночні відхилення, що виходять за межі допустимої похибки досліджень. Важливою проблемою є диференціація грубої помилки від показників, що є результатом відхилення від норми у результаті патології.

Причинами грубих помилок є неправильні розрахунки, кількісні похибки при додаванні реагентів, порушення методики тощо. Щоб уникнути систематичних та грубих помилок, необхідним є зазначення у

журналі будь-яких відхилень, появи нетипових показників, аналіз цих відхилень.

Зберігання зразків крові. Для одержання сироватки крові пробірку залишають за кімнатної температури до моменту утворення згустку (10–15 хв). Відділити сироватку або плазму необхідно як можна швидше. Відстоювати кров необхідно у темному місці: світло викликає швидке руйнування прямого білірубіну. Зберігати сироватку чи плазму необхідно у холодильнику. Якщо кров, що не згорнулася, помістити до холодильника, виникає гемоліз.

Кров для визначення глюкози відбирають у спеціальні пробірки з фторидом натрію, – за звичайних умов зберігання концентрація глюкози зменшується на 10 % за кожну годину.

Фактори при відборі крові, що впливають на результати досліджень:

- за тривалого стискання судини зростає концентрація загального білка, ліпідів, білірубіну, Кальцію, Калію, активності ферментів;
- плазму не можна використовувати для визначення Калію, Кальцію, Фосфору;
- концентрація більшості показників може відрізнятися у сироватці та плазмі; у сироватці вища концентрація таких речовин: альбуміни, загальний білок, активність лужної фосфатази, амілази, глюкоза, сечова кислота; концентрація у сироватці нижча, ніж у плазмі, таких речовин: Калій, Фосфор, активність АСТ, ЛДГ; концентрація однакова як у плазмі, так і у сироватці: білірубін, сечовина, активність АЛТ, КФК;
- високі концентрації білірубіну, ліпемія і мутність завищують значення холестеролу, Магнію;
- концентрація білірубіну знижується на 30–50 %, якщо сироватка або плазма перебуває під дією прямого денного освітлення 1–2 години;
- фізичні навантаження, голодування, ожиріння, годівля

тварин, травми, оперативні втручання, внутрішньом'язові ін'єкції викликають підвищення активності ферментів: АЛТ, АСТ, ЛДГ, КФК;

– у *молодих тварин* активність ЛДГ, ЛФ вища, ніж у дорослих тварин, а активність амілази – нижча;

– *застосування кортикостероїдів або підвищений вміст ендогенних кортикостероїдів* підвищує активність ЛФ, ГГТ, ліпази у собак.

Як згадувалось вище, певні відхилення можуть виникати при неправильному підборі антикоагулянта, збільшенні його кількості. Однією з обов'язкових вимог є відсутність слідів гемолізу у плазмі або сироватці. *Сліди гемоглобіну збільшують оптичну густину*, а оскільки більшість показників визначаються методом спектрометрії, то є небезпека одержання завищених результатів, зокрема домішки гемоглобіну суттєво впливають на рівень фосфору, білірубіну. Гемоліз суттєво впливає на вміст калію, який переважно міститься в еритроцитах, на вміст білка. Підвищений вміст білірубіну може давати хибні результати при дослідженні креатиніну, гемоглобіну.

Гемолізовану кров *не можна* використовувати для визначення Калію, Магнію, Феруму, креатиніну, білірубіну, активності АЛТ, АСТ.

Однією з причин, яка суттєво впливає на біохімічні показники, є *термін зберігання крові*. При перевищенні терміну зберігання як цільної крові, так і сироватки та плазми, спостерігається інтенсифікація катаболічних процесів, зокрема окиснення глюкози, розпад білків, збільшення вмісту аміаку. Особливу увагу слід звертати на зразки крові, призначені для визначення парціального тиску газів, лужного резерву, їх бажано відбирати шприцом або відразу переносити у герметично закриті пробірки. Зберігання крові при вільному доступі повітря призводить до поглинання вуглекислого газу, збільшення концентрації карбонатної кислоти.

Окремо слід звернути увагу на *кров з ознаками ліпемії*. Зовні цю кров можна легко помітити за дещо блідо-червоним забарвленням,



Рис. 3.1. Кров з явищами гемолізу

високою лужністю, при зберіганні на поверхні з'являється світлий шар хіломікронів (рис. 3.2). Наявність у крові ліпідів може давати як хибне завищення, так і хибне заниження результатів.

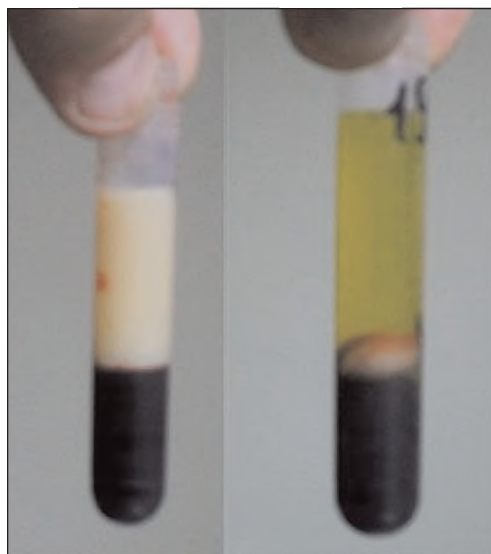
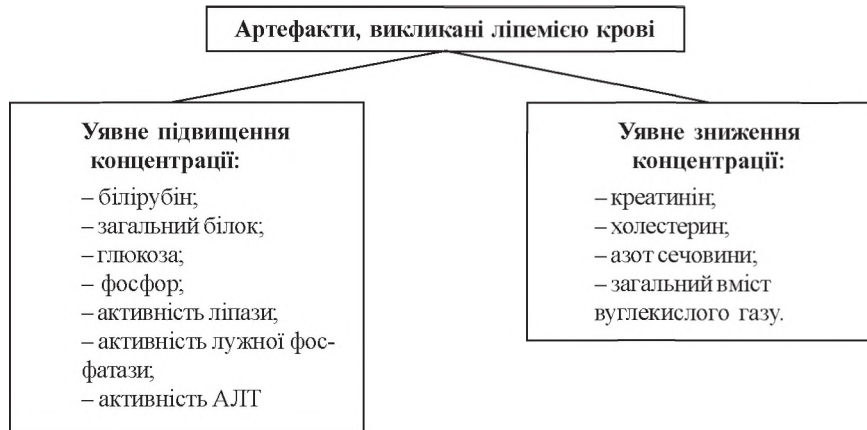


Рис. 3.2. Зразки крові: праворуч – нормальний, ліворуч – з ознаками ліпемії



Ліпемія призводить до зменшення стійкості еритроцитів і як, результат, до гемолізу.

Деколи перед дослідженням крові проводять *визначення кольору крові*, оскільки наявність аномального кольору крові є свідченням патології, з одного боку, а з іншого, може давати артефактні показники.

Коричнєве забарвлення свідчить про наявність метгемоглобіну, вишневий відтінок виникає при отруєнні ціанідами, а поява яскраво-червоного забарвлення – отруєння чадним газом.

Таким чином, висока точність вимірювань забезпечується зменшенням похибки, застосуванням уніфікованих методик, стандартизацією, чітким дотриманням вимог методики, контролем клініко-діагностичних досліджень на всіх етапах їх проведення.

Питання для самоконтролю

1. Які причини випадкових помилок, що можуть виникати при лабораторних дослідженнях?
2. За яких умов виникають систематичні похибки лабораторних досліджень, яким чином можливо їх уникнути?
3. Яким чином змінюється концентрація окремих біохімічних показників при порушенні умов відбору та зберігання зразків крові?
4. Як впливає ліпемія на результати досліджень?
5. Як впливає наявність вільного гемоглобіну на результати біохімічних досліджень?
6. Про що свідчить зміна кольору крові і яким чином вказані зміни можуть впливати на результати досліджень?

ЗМІСТ

<i>Вступ</i>	3
<i>Список скорочень</i>	5
<i>Розділ 1.</i> Кров як об'єкт досліджень	7
<i>Розділ 2.</i> Методи біохімічних досліджень	13
<i>Розділ 3.</i> Артефакти біохімічних досліджень	26
<i>Розділ 4.</i> Інтерпретація змін білкового складу та вмісту азотистих сполук крові тварин	32
<i>Розділ 5.</i> Інтерпретація змін вуглеводного складу крові	65
<i>Розділ 6.</i> Інтерпретація змін ліпідного складу крові	80
<i>Розділ 7.</i> Інтерпретація змін ферментного складу крові	98
<i>Розділ 8.</i> Інтерпретація показників обміну вітамінів у організмі тварин ..	141
<i>Розділ 9.</i> Інтерпретація показників обміну води та електролітів у організмі тварин	197
<i>Розділ 10.</i> Інтерпретація показників обміну макро- та мікроелементів	219
<i>Розділ 11.</i> Інтерпретація показників функціонування ендокринної системи тварин	270
<i>Розділ 12.</i> Клінічна оцінка функціональної активності системи гемостазу тварин	310
<i>Розділ 13.</i> Клінічна оцінка показників кислотно-лужної рівноваги крові	345
<i>Розділ 14.</i> Інтерпретація показників загального (клінічного) аналізу крові тварин	359
<i>Розділ 15.</i> Інтерпретація показників біохімічного складу сечі тварин	414
<i>Розділ 16.</i> Біохімічні зміни у крові та сечі за деяких незаразних патологій тварин	473
<i>Додатки</i>	526
<i>Список використаних джерел</i>	534