

Министерство образования и науки Республики Казахстан  
Костанайский региональный университет имени А.Байтурсынова  
Кафедра ветеринарной медицины

Л.С. Кулакова, А.Г. Жабыкпаева

**Общие и специальные методы исследования  
крови птиц**  
Учебное пособие

Костанай, 2021

**УДК: 619 (075.8)**

**ББК 48.7я73**

**К 90**

**Авторы:**

Кулакова Любовь Степановна кандидат ветеринарных наук, профессор кафедры ветеринарной медицины

Жабыкпаева Айгуль Габызхановна магистр ветеринарных наук, преподаватель кафедры ветеринарной медицины

**Рецензенты:**

Пионтковский Валентин Иванович – доктор ветеринарных наук, профессор КГУ имени А.Байтурсынова

Сулейманова Куляй Уразгалиевна – кандидат биологических наук, профессор кафедры ветеринарной медицины

Папуша Анна Владимировна – кандидат сельскохозяйственных наук, главный зоотехник ТОО «Жас-Канат 2006» г. Рудный

Кулакова Л.С., Жабыкпаева А.Г.

К 90 Общие и специальные методы исследования крови птиц: Учебное пособие.- Костанай: КРУ имени А.Байтурсынова, 2021.- 108с.

В учебном пособии даны подробные методики отбора и подготовки проб крови для различных видов исследования. Составляющие гематологического, биохимического, иммунологического исследования крови птицы. Представлены методики перекрестного окисления липоидов и систем антиоксидантной защиты организма, показатели углеводного, белкового и жирового обмена веществ.

Предназначено для студентов ветеринарных и зоотехнических специальностей, работников ветеринарных лабораторий птицеводств, специализированных лабораторий по болезням птиц, научным работникам и руководителям птицеводческих хозяйств.

УДК 619 (075.8)

ББК 48.7я73

Утверждено и рекомендовано к изданию Учебно-методическим советом Костанайского регионального университета имени А.Байтурсынова 24.02.2021г., протокол № 2

ISBN 978-6001-356-008-3

© Костанайский региональный университет им. А. Байтурсынова, 2021  
© Кулакова Л.С., Жабыкпаева А.Г., 2021

## Содержание

1. Введение.....	3
2. Кровь и ее взаимосвязь с иммунитетом у птицы.....	4
3. Отбор и подготовка проб крови птиц.....	7
4. Получение сыворотки крови птиц.....	7
5. Гематологические исследования.....	9
6. Биохимические исследования.....	20
7. Показатели естественной резистентности организма птиц.....	24
8. Иммунологические исследования.....	32
9. Перекрестное окисление липоидов и система антиоксидантной защиты организма.....	38
9.1. Методы определения продуктов перекисного окисления липидов	40
9.2. Методы определения ферментативных показателей системы антиоксидантной защиты организма.....	45
9.3. Методы определения неферментативных показателей системы антиоксидантной защиты организма.....	58
9.4.Хемилюминесцентный анализ.....	64
10. Показатели белкового, жирового, углеводного и минерального обменов.....	67
Приложение.....	93
Литература.....	108

## ВВЕДЕНИЕ

Кровь является жидкой тканью организма, в которой отражается его физиологическое состояние. Она осуществляет связь всех органов и систем между собой и организма в целом с внешней средой. Морфологический, биохимический и иммунологический анализ крови представляет одно из самых тонких и объективных средств для суждения о состоянии исследуемого организма. Особенно велико значение изучения «картины крови» для клинической диагностики болезней.

Для массового внедрения методов морфологических, биохимических и иммунологических исследований в ветеринарную практику необходимо, чтобы ветеринарный врач – исследователь знал в первую очередь разнообразные формы клеток крови и их функциональное значение с учетом физиологических особенностей разных видов птиц, умел правильно анализировать полученные результаты исследований картины крови при возникающих патологических состояниях.

Интенсивность процессов отдельных видов обмена существенно различается в органах и тканях в зависимости от их структурно-морфологической особенности и функционального назначения. Обмен веществ в организме птиц, как и у других живых организмов, обусловлен сложными биохимическими реакциями всех биологически активных и питательных веществ, поступивших с кормом, водой и образующихся в организме.

Несмотря на постоянное поступление в кровь и выделение из неё различных продуктов обмена веществ, химический состав её при оптимальном течении процессов обмена здорового организма быстро выравнивается и остаётся довольно постоянным (гомеостаз). Только при срыве регуляции и значительных изменениях течения обменных процессов существенно изменяется уровень метаболитов и конечных продуктов обмена в крови.

Кровь состоит из плазмы и форменных элементов, после удаления которых остаётся густая соломенного цвета жидкость - плазма. При свертывании цельной крови образуется кровяной сгусток и отделяется сыворотка. В ней содержатся все вещества крови, кроме форменных элементов и фибриногена и она чаще всего используется для проведения химических и биохимических исследований. Однако, иногда для оценки состояния обмена веществ и характеристики здоровья животных и птиц необходимы исследования цельной крови.

Внедрение исследований крови в повседневную клиническую практику ветеринарных врачей является весьма эффективным в сохранении здоровья и повышении продуктивности сельскохозяйственных животных и птиц. Значительный вклад в решение этой проблемы внесли известные отечественные ученые А.А.Кудрявцев, И. А. Болотников, Ю. В. Конопатов, Л. С. Колабская, В. М. Митюшников и др. Изданные ими пособия и практические руководства и сегодня не потеряли практического значения,

Тем не менее, возникает необходимость в обобщении ранее известных методов исследования по гематологии, биохимии и иммунологии и дополнения их новыми методами, которые апробированы на практике.

## **2. КРОВЬ И ЕЕ ВЗАИМОСВЯЗЬ С ИММУНИТЕТОМ У ПТИЦ**

Различают наружные (кожа, слизистые оболочки) и внутренние защитные факторы животного организма (лизоцим, комплемент, антитела, пропердин, бета-лизины и др.). Свежеполученная кровь птиц обладает способностью задерживать рост (бактериостатическая способность) или вызывать гибель (бактерицидная способность) микроорганизмов многих видов. Эти свойства крови и ее сыворотки обуславливаются содержащимися в ней лизоцимом, комплементом, пропердином, интерфероном и присутствием бактериолизин, способных растворять бактериальные клетки. Бактериолизины активны лишь в комплексе с комплементом. Содержание и уровень комплемента в крови наряду с другими показателями используют как тест, характеризующий состояние естественной резистентности птиц. Способность лизоцима лизировать микробы чрезвычайно высока. Лизоцимы, выделенные из различных источников, различаются по своей ферментативной активности, химическому составу и физическим свойствам (В.М.Митюшников, 1985).

В результате перенесенных болезней в крови появляются антитела. Химическая природа антител хорошо известна (В.М.Митюшников, 1985; И.А. Болотников, Ю.В Конопатов, 1987). Все они являются специфическими белками - гамма-глобулинами.

Антитела различают по характеру взаимодействия с антигенами. Антитела, нейтрализующие яды (токсины) - антитоксины. Антитела, растворяющие бактерии - бактериолизины; антитела, осаждающие белки - преципитины. Нормальные (естественные) антитела присутствуют в сыворотке крови практически всегда и принимают постоянное участие в неспецифической защите.

В сыворотке крови птиц из распадающихся лейкоцитов освобождаются особые, устойчивые к температуре бактерицидные вещества - лейкины.

Между гуморальными и клеточными факторами иммунитета существует тесное взаимодействие. Так антитела (опсонины, агглютинины) способствуют фагоцитозу тем, что они присоединяются к патогенным бактериям и делают их более доступными для захватывания фагоцитарными клетками и их переваривания. В отношении вирусов значение фагоцитарных реакций невелико. Однако, появление самих антител связано с клетками, образующими антитела. Они служат продуктом иммунокомпетентных клеток. Клеточная реакция на чужеродный антигенный агент обеспечивает образование антител, нейтрализующих токсины, что способствует их полному разрушению. Этот процесс происходит в фагоцитарных клетках.

К другим неспецифическим факторам защиты относят интерферон и вирусные ингибиторы. Интерферон вырабатывают фагоцитарные,

эпителиальные клетки. Он ограничивает число восприимчивых клеток. В отличие от антител, специфически направленных на вирус, интерферон влияет только на клетки. Интерферон, возникший в клетках под действием одного вируса, эффективен и по отношению ко всем другим вирусам. Однако действие его кратковременно (И.А.Болотников, Ю. В. Конопатов, 1987).

Существуют возрастные особенности формирования естественной резистентности птиц. Реактивные свойства в растущем организме складываются постепенно и окончательно формируются лишь на определенном уровне общепфизиологического созревания. Ранний постнатальный период развития птиц характеризуется состоянием пониженной реактивности организма, выражающейся слабым проявлением неспецифических гуморальных факторов, недостаточной защитной силой кожно-перьевого покрова и слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта. По мере развития реактивность организма птиц постепенно усложняется и совершенствуется, что связано с развитием желез внутренней секреции, формированием определенного уровня обмена веществ, совершенствованием защитных приспособлений против инфекций, интоксикаций и т.д. (Л.Н. Соколова, 1989, В.А.Бакулин, 1994, Гладков, 1990).

К началу яйцекладки в организме птиц происходят существенные изменения, обуславливающие белковую картину крови. Количество белка возрастает, этот рост осуществляется в основном за счет глобулиновых фракций. По мере снижения интенсивности яйцекладки содержание общего белка и гамма-глобулинов несколько снижается (В.М. Митюшников, 1985).

С возрастом у цыплят усиливается поглотительная способность ретикулоэндотелиальной системы. Активность лизоцима наиболее выражена в 5-дневном возрасте (1:900), в возрасте 10-20-30 дней она соответственно уменьшается до 1:264, 1:550, 1:290. Синтез нуклеиновых кислот наиболее выражен у цыплят раннего постнатального периода, а к 30-дневному возрасту он снижается.

У взрослых кур содержание в крови нуклеиновых кислот выше, чем у молодняка. Отмечено, что уровень нуклеиновых кислот и гемоглобина больше у мясных пород, чем у яичных.

Исследования, проведенные Л.С. Колабской (1982) на молодняке кур яичных и мясных кроссов, говорят о том, что естественная резистентность цыплят с 5 до 20- дневного возраста находится на низком уровне. Активность гемолитического комплемента у бройлерных цыплят определялась в сыворотке крови каждые 14 дней в течение 42 дней после рождения. С возрастом титр гемолитического комплемента повышался с 1:4 до 1:33 и практически не зависел от пола.

Установлено, что наивысшая выводимость яиц отмечена в группах кур с высоким уровнем лизоцима в белке (от 7 до 10 мг/мл), а повышенная смертность эмбрионов выявлена при его минимальном содержании. Сохранность цыплят, выведенных из яиц с высоким содержанием лизоцима, оказалась на 2-3% выше, чем из яиц с низким его уровнем.

По данным В. М. Митюшникова (1985), яйца с наиболее высокими инкубационными качествами можно получить от кур в возрасте 210-330 дней (вывод цыплят был выше на 3 -5%). В этот период установлена и максимальная лизоцимная активность белка яиц, а соответственно и высокая естественная резистентность молодняка, выведенного из таких яиц. Выявлены значительные индивидуальные колебания содержания и активности лизоцима в белке яиц, что позволяет вести селекционную работу по этому показателю.

При иммунном ответе птиц, как и у млекопитающих, участвуют два типа лимфоцитов, которые различаются по происхождению, дифференцировке и по иммунологическим функциям. Т-лимфоциты образуются в тимусе из поступающих в него стволовых клеток костного мозга. В процессе пролиферации и дифференцировки под влиянием веществ, выделяемых тимусом, образуются сначала предшественники - лимфоциты тимуса, а из них Т-лимфоциты, поступающие в кровь. В - лимфоциты образуются из стволовых клеток в фабрициевой сумке. Здесь происходит их антигензависимая пролиферация и дифференцировка, в результате которой В-клетки, достигнув определенной стадии развития, поступают в кровь и отсюда заселяют периферические лимфоидные органы и ткани. Лимфоциты осуществляют иммунологический надзор и уничтожают генетически чужеродные элементы непосредственно или вырабатывая антитела (И. А. Болотников, Ю. В. Конопатов, 1987).

Контрольные вопросы:

1. Какими способностями обладает свежеполученная кровь?
2. Что обеспечивает клеточная реакция на чужеродный антиген?
3. Когда наиболее выражена активность лизоцима у птиц?
4. Какие типы лимфоцитов участвуют в иммунном ответе?
5. Какие антитела существуют по характеру взаимодействия с антигенами?

### **3. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ПРОБ КРОВИ ПТИЦ**

#### **Взятие крови у эмбрионов птиц**

Перед взятием крови эмбрион, вынутый из инкубатора, просматривают на овоскопе, находят самый крупный сосуд и карандашом на скорлупе отмечают место взятия крови. В отмеченном месте осторожно с помощью ножниц и пинцета снимают скорлупу, разрезают подскорлупную оболочку и пипеткой осторожно отсасывают аллантоисную жидкость. При этом объем содержимого яйца уменьшается и обеспечивается возможность свободного поднятия кровеносного сосуда на скорлупу у места вскрытия. Чтобы избежать попадания аллантоисной жидкости в пробу крови, кровеносный сосуд подсушивают фильтровальной бумагой и затем разрезают ножницами. Мазки крови готовят обычным способом.

#### **Взятие крови у кур**

Кровь у кур берут из гребня или из вены с внутренней стороны крыла над локтевым сочленением путем прокола. Место взятия крови обрабатывают спиртом. Кровь для исследования стабилизируют. В качестве стабилизатора применяют:

- 4%-ный раствор лимоннокислого натрия 0,1 мл на 1 мл крови;
- 1% -ный раствор гепарина 2-3 капли на 10 мл крови;
- 10%-ный раствор ЭДТА (трилон-Б) 1 капля на 1 мл крови.

Контрольные вопросы:

1. Откуда берут кровь у кур?
2. Как происходит взятие крови у эмбрионов птиц?
3. Что используют в качестве стабилизатора крови?

### **4. ПОЛУЧЕНИЕ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПТИЦ**

1. Для исследований необходима прозрачная сыворотка крови соломенно-жёлтого цвета без следов гемолиза в объёме 2 мл для одновременного проведения исследований комплексом методов.

2. Кровь следует брать у птиц натошак, без ограничения питьевой воды, в возрасте 1 - 20 дней - тотально, а с 30-дневного возраста – из подкрыльцовой вены без шприца по 5-6 мл индивидуально в стерильные пробирки Флоринского, предварительно орошенные физраствором.

3. Важно, чтобы кровь не подвергалась резким температурным колебаниям, поэтому взятие крови лучше проводить в помещении при температуре выше 20 °С. После свёртывания кровь необходимо обвести и отстаивать сыворотку в течение 15 – 20 минут в термостате или водяной бане при температуре 39°С.

4. Если в помещении температура меньше 20 °С, то пробирки с кровью после её взятия сразу же поместить в термос или сосуд с тёплой водой (39 °С), затем в термостат на 15 – 20 минут при температуре 39 °С, после чего



кровь оставляют на отстаивание сыворотки при комнатной температуре не менее 1 часа.

5. Исследование сыворотки крови следует проводить в течение суток после взятия крови.

6. Определение показателей естественной резистентности организма птиц необходимо проводить с учётом возраста, породы, особенностей кормления, содержания птицы и ветеринарно-санитарных мероприятий, проводимых в птицеводствах.

Контрольные вопросы:

1. В каком объеме берется сыворотка крови для исследований?
2. В течение какого времени проводится исследование сыворотки крови?
3. Откуда берут кровь у птиц, начиная с 30-дневного возраста?

## 5. ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гематологическое исследование крови является одним из важнейших диагностических методов, тонко отражающих реакцию кроветворных органов при воздействии на организм различных физиологических и патологических факторов. Во многих случаях оно играет большую роль в постановке диагноза, а при заболеваниях системы кроветворения ему отводится ведущая роль.

### Эритроциты

Эритроциты и тромбоциты птиц в отличие от эритроцитов и тромбоцитов животных содержат ядро (рисунок 1), которое раствор уксусной кислоты (жидкость Тюрка) не разрушает, что препятствует подсчету лейкоцитов. Подсчет эритроцитов и лейкоцитов осуществляют одновременно в камере Горяева по общепринятой методике. Для окрашивания используют краску по Фриеду и Лукачевой в модификации И. А. Болотникова (0,9 г NaCl, 3,35 г CaCl<sub>2</sub>, 90 мл дистиллированной воды, 6 мл краски Гимза, 3 мл 1% спиртового раствора метилвиолета, 1 мл формалина). Кровь разводят этой краской в меланжере для эритроцитов. Лейкоциты окрашиваются в фиолетовый цвет, а эритроциты остаются неокрашенными. Вычисляют количество клеток по общепринятым формулам.

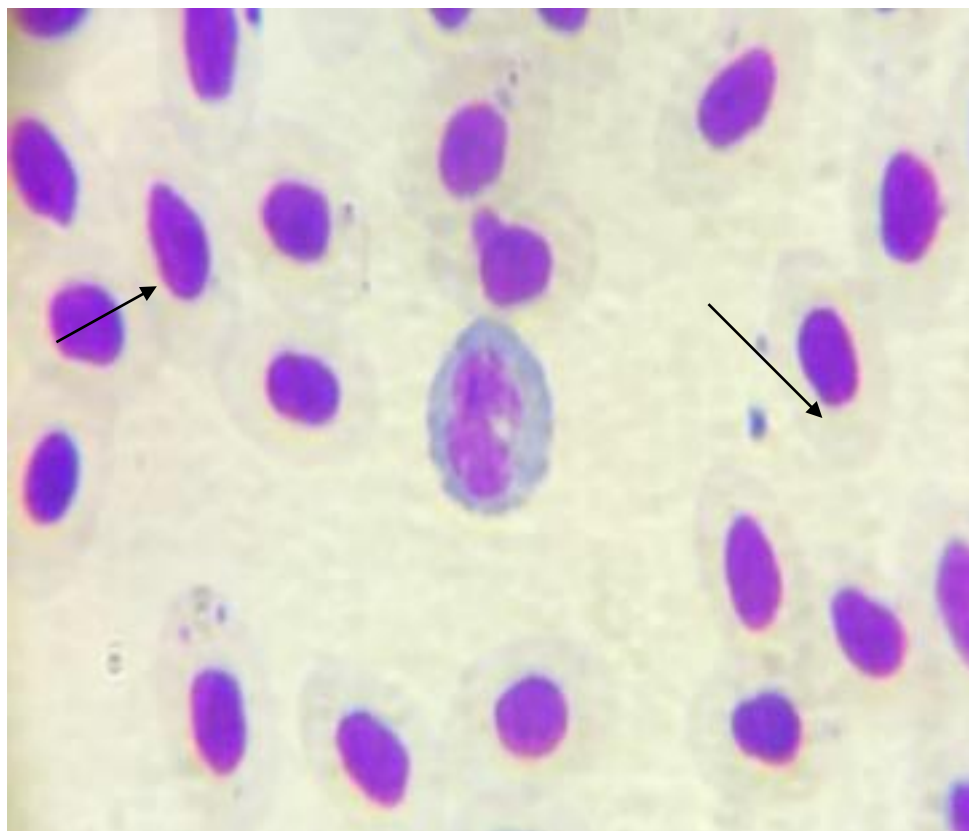


Рисунок 1 – Эритроциты птицы

### Ход определения.

Каплей разведенной крови заполняют счетную камеру Горяева и после осаждения в камере подсчитывают клетки под микроскопом (увеличение

40\*15/20). Сетка Горяева разделена на 100 больших (по 4 вместе) и 400 малых квадратов (по 16 квадратов вместе). Площадь малого квадрата равна 1/400 мм<sup>2</sup>, объем - 1/4000 мм<sup>3</sup>, а большие квадраты по площади соответствуют 16 малым. Малые квадраты служат для подсчета эритроцитов, большие - для подсчета лейкоцитов. Считают эритроциты в 80 маленьких квадратах (5 больших квадратов). Подсчету подлежат в каждом маленьком квадрате эритроциты, находящиеся внутри него, а также замкнутые полностью или частично верхней и левой его границами, и не считают клетки, касающиеся правой и нижней его границ. Для подсчета берут большие квадраты, лежащие по диагонали. Число эритроцитов, подсчитанных в каждом маленьком квадрате, складывают и получают их общее количество.

Количество эритроцитов в 1 мм<sup>3</sup> крови исчисляют по формуле 1:

$$X = a * 4000 * v / b, \quad (1)$$

где x - число эритроцитов в 1 мм<sup>3</sup> крови; a - число эритроцитов, подсчитанных в 80 квадратах; b - число сосчитанных квадратов; v - степень разведения крови.

#### **Аналогично подсчитывают количество тромбоцитов**

Подсчет в камере лучше проводить при большом увеличении (объектив 40, окуляры 20). Лейкоциты и тромбоциты хорошо видны на фоне неокрашенных эритроцитов. Лейкоциты округлой формы, тромбоциты имеют форму веретена с тупыми концами.

**Тромбоциты** - безъядерные клетки диаметром 2-4 мкм, являющиеся «осколками» цитоплазмы мегакариоцитов костного мозга. Продолжительность жизни тромбоцитов составляет 7—10 дней. Физиологические колебания количества тромбоцитов в крови в течение суток — примерно 10 %. Тромбоциты участвуют в процессах свертывания и фибринолиза, обеспечивают ретракцию кровяного сгустка. Они способны переносить на своей мембране циркулирующие иммунные комплексы, поддерживать спазм сосудов.

**Лейкоциты** — клетки крови, образующиеся в костном мозге. Количество лейкоцитов в крови зависит от скорости притока клеток из костного мозга и скорости выхода их в ткани. Лейкоциты - служат важным звеном механизма иммунологической защиты, взаимодействуя с лимфоидными клетками в определенных фазах иммунологических реакций. Благодаря их фагоцитарной активности, участию в клеточном и гуморальном иммунитете, обмену гистамина, гепарина реализуются антимикробные, антитоксические, антителообразующие и другие важнейшие компоненты иммунологических реакций. К лейкоцитам относятся клетки гранулоцитарного, моноцитарного и лимфоидного рядов.

Увеличение количества лейкоцитов в периферической крови называют — лейкоцитоз, уменьшение — лейкопения. При лейкоцитозе иногда увеличивается количество всех видов лейкоцитов, но чаще только отдельных

групп: нейтрофилов, эозинофилов, моноцитов, лимфоцитов. То же самое можно наблюдать и при лейкопении. Иногда увеличения общего числа клеток белой крови не наблюдается, а отмечается изменение только процентного соотношения их. Причинами таких изменений могут быть патологические нарушения в организме, вызванные инфекцией, интоксикацией, нарушением обмена и т. д., а также изменениями физиологического порядка.

### ***Подсчет количества лейкоцитов в камере Горяева***

#### **Ход определения.**

В пробирку вносят 0,4 мл жидкости Тюрка (на 100 мл 1-3 % раствора ледяной уксусной кислоты 1 мл 1% раствора метиленового синего) и капиллярной пипеткой 0,02 мл крови. Содержимое пробирки аккуратно перемешивают. Чистое, сухое покровное стекло притирают к камере так, чтобы появились радужные кольца. Подсчитывают в 25 больших (чистых) квадратах, начиная с левого верхнего угла сетки и далее сверху вниз по диагонали направо (20 квадратов). Четыре квадрата в верхнем правом углу и один квадрат в левом нижнем углу. Подсчитывают в 25 квадратах клетки, умножают на два. Количество лейкоцитов у всех видов птиц по сравнению с млекопитающими животными в несколько раз выше и колеблется в широких пределах (от 20 до 40 тыс. в 1 мкл крови).

**Гемоглобин** - дыхательный пигмент крови, состоит из белка глобина и протатической группы - гемма. Глобин по строению близок к альбумину, синтезируется в печени, представляет хелатный комплекс - протопарферина с двухвалентным железом.

Основная функция гемоглобина - перенос кислорода от легких тканям. Гемоглобин участвует в транспорте углекислого газа из тканей в легкие, в поддержании кислотно-основного равновесия в организме, т.е. обладает буферными свойствами. Он способен соединяться с оксидом углерода, образуя карбоксигемоглобин, а также с некоторыми химическими веществами с образованием метгемоглобина. Эти соединения не способны переносить кислород от легких тканям.

### ***Определение гемоглобина крови гемиглобинцианидным методом***

**Принцип метода.** Гемоглобин при взаимодействии с железосинеродистым калием окисляется в метгемоглобин (гемиглобин), образующий с ацетонциангидрином окрашенный гемиглобинцианид, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию гемоглобина. Кровь с антикоагулянтом хранят в течение 24 ч при 2 - 8<sup>0</sup>С, 8 ч при комнатной температуре - 15 - 20<sup>0</sup>С.

#### **Реактивы.**

1. Трансформирующий раствор (ацетонциангидрин 0,5 мл, калий железосинеродистый 200 мг, натрий двууглекислый 1 г, дистиллированная вода до 1 л); стабилен при хранении в посуде из темного стекла в течение 3 мес., при появлении осадка или обесцвечивании раствор к употреблению не пригоден.

2. Стандартный раствор гемиглобинцианида, соответствующий концентрации гемоглобина крови 15 г % при разведении крови в 251 раз.

#### Оборудование.

Фотоэлектроколориметр; пипетки на 0,02 мл; колба мерная на 1 л. Ход определения.

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 гемоглобина (г%) проводят по формуле 2:

$$H = E_{\text{оп}}/E_{\text{ст}} \times 15, \quad (2)$$

где  $E_{\text{оп}}$  - экстинкция опытной пробы,  $E_{\text{ст}}$  - экстинкция стандартного раствора, 15 - соответствие стандартного раствора концентрации гемоглобина крови при ее разведении в 251 раз.

Для перевода г % в г/л найденное число умножают на 10.

#### Гемоглобиновый профиль

Гемоглобин кур, как и большинства других птиц, представлен двумя фракциями – Hb A и Hb D. Их соотношение выражено в пропорции 3:1. Доминирующим является гемоглобин A, тогда как гемоглобин D является минорным, содержание его в норме в периферической крови не превышает 30%. Для исследования гетерогенной системы гемоглобина используется метод электрофореза в полиакриламидном геле.

Цветной показатель отражает относительное содержание гемоглобина в эритроците. Определяется делением содержания гемоглобина (г/л) на количество эритроцитов в 1 мкл крови. У птиц цветной показатель может варьировать от 1 до 3. Уменьшение цветного показателя ниже 1 связано с гипохромной анемией. По величине ЦП анемии принято делить на гипо-, нормо- и гиперхромные.

#### Скорость оседания эритроцитов (СОЭ)

Эритроциты, как и другие клетки крови, несут на своей поверхности электрический заряд. Наличие у эритроцитов отрицательного заряда способствует их взаимному отталкиванию и поддержанию во взвешенном состоянии. Препятствуют быстрому оседанию эритроцитов альбумины, если их содержание в крови велико. Ускорению оседания эритроцитов способствуют глобулины, фибриноген, мукополисахариды, содержание которых увеличивается при многих воспалительных процессах. Ускоренная СОЭ не является специфическим показателем для какого-либо определенного заболевания.

*Определение скорости оседания эритроцитов 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 – плазму. Это расслоение происходит с различной скоростью в зависимости от изменений химических и физических свойств крови.

#### Реактивы.

4 %-ный раствор натрия цитрата. Раствор фильтруют, рН раствора нейтральный или слабощелочной. Реактив нестойкий, при помутнении раствор необходимо заменить.

#### Оборудование.

Пробирки размером 10×1 см; аппарат Панченкова, состоящий 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 стоят цифры 10, 20, 30 и т.д. до 100; против деления 50 – буква «Р» (реактив). Отверстия концов капиллярных пипеток, вставленных в прибор, герметически закрываются резиновыми прокладками или пробками, и кровь из пипеток не выливается. Капиллярные пипетки и пробирки должны быть хорошо промыты хромовой смесью.

#### Ход определения.

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

Расчет. Скорость оседания определяют за 1 ч.

**Гематокрит** - соотношение объема плазмы и форменных элементов крови, выраженное в процентах по объему. Увеличение гематокритной величины отмечают при анемиях и кровопотерях, уменьшение - при сгущении крови, обезвоживание организма. Для объективной оценки лабораторных показателей крови определение гематокрита обязательно.

#### ***Определение гематокрита с использованием пипеток Панченкова***

Оборудование: центрифуга; пипетки Панченкова или другие градуированные микропипетки.

#### Ход определения.

В обработанную антикоагулянтом (или необработанную) пипетку Панченкова с отрезанным верхним концом набирают кровь точно до верхней метки, закупоривают ее, обтягивая резиновым кольцом, и центрифугируют 30 мин при 3000 мин<sup>-1</sup>. Для каждой центрифуги устанавливают определенное время работы. Вычитают из 100 высоту столбика эритроцитов и получают гематокритную величину в процентах. Подобным методом определяют гематокрит в пипетках или пробирках иного типа.

### **Лейкоцитарная формула**

Лейкоцитарную формулу определяют путем подсчета лейкоцитов в окрашенных мазках крови. Посчитывают обычно 100 или 200 клеток и выражают в процентах.

#### **Приготовление мазка крови**

Первую каплю крови снимать ватой, вторую использовать для приготовления мазка. Кровь берут стеклом под углом 45 ° слева от капли и слегка продвигают вправо до соприкосновения с каплей, пока она не расплывется по ребру шлифовального стекла, после чего быстрым и легким движением стекло ведут слева направо. В результате капля крови размазывается по стеклу тонким слоем. Вследствие наличия ядер в эритроцитах, мазки крови кур должны быть значительно тоньше, чем мазки крови других животных. Приготовленные мазки сушат на воздухе. Ставят номер птицы.

#### **Окраска мазка**

Лучшим фиксатором мазков является химически чистый метиловый спирт нейтральной реакции. В нем мазок выдерживают в течение 5 минут. Фиксируют мазки крови также абсолютным метиловым спиртом в течение 20-30 минут; ацетоном – 5 минут; смесью спирта и эфира в равных количествах – 10-20 минут; смесью ацетона и метилового спирта в равных количествах – 5 минут; 1% водным раствором осмиевой кислоты – 0,5-1 час (употребляется для выявления оксихроматина, митохондрий и centrosомы). Фиксатор наливают на мазок, но лучше мазок помешать в фиксирующую жидкость, налитую в банку с притертой пробкой. Для получения хорошего окрашивания мазка важно, чтобы вода, используемая для разведения красителя, была нейтральной реакции. При употреблении воды кислой реакции мазки окрашиваются в интенсивно красный цвет, а в воде щелочной реакции в них преобладают синие тона. Правильно же окрашенный мазок имеет розовато-фиолетовый цвет.

#### ***Метод Паппенгейма***

Предварительной фиксации мазка не требуется, т.к. краситель Май - Грюнвальда готовят на метиловом спирте. На мазок наносят 2 мл готового красителя Май-Грюнвальда на 3 минуты, затем приливают столько же дистиллированной воды и смешивают с красителем, через минуту краску сливают. Не ополаскивая, мазок докрасивают красителем Романовского-Гимза, приготовленным из расчета 15 капель готового красителя на 10 мл воды. Окрашивание мазка проводят 10-15 минут, затем смывают краску сильной струей воды. Этот способ окрашивания хорошо выявляет зернистость протоплазмы клеток красителем Май-Грюнвальда и четко окрашивает структуру ядра раствором красителя Романовского-Гимза.

#### **Исследование окрашенного мазка крови птиц**

Окрашенным мазком пользуются для изучения величины, формы, окраски и структуры эритроцитов и детального ознакомления с белой кровью. Исследуют мазок под микроскопом с иммерсионной системой.

### **Эритроциты**

В мазке нормальной крови эритроциты имеют сравнительно одинаковую форму. У птиц они овальные, содержат ядро, которое образует двухстороннюю выпуклость. Протоплазма эритроцитов птиц красится ацидофильно, ядро – базофильно.

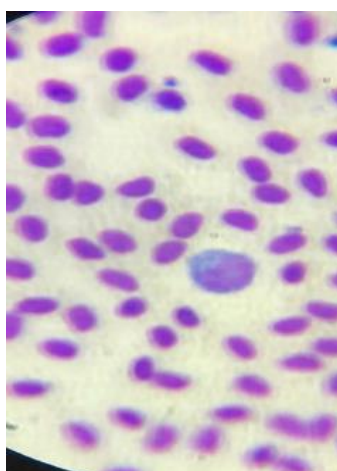
### **Тромбоциты**

Имеют форму веретена с тупыми концами. Ядро находится в центре, пикнотично и имеет слабовыраженную сетчатость. У полюса ядро имеет 1-3 хроматиновых зернышка, окрашивающихся по Романовскому в малиново-красный цвет. В протоплазме видны 1-3 азурофильных зернышка. Тромбоциты лежат группами.

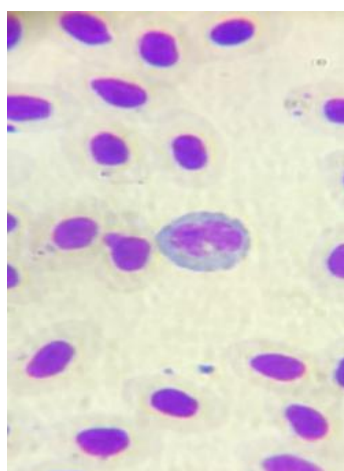
### **Лейкоциты**

Несколько меньшего размера, чем у млекопитающих.

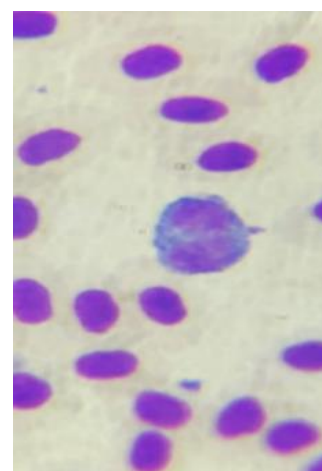
Нами сделаны фотографии всех форменных элементов крови, соответственно рисунков 2 (а,б,в)



а. Юные



б. Палочкоядерные



в. Сегментоядерные

Рисунок 2 – нейтрофилы: а)юные, б)палочкоядерные, в)сегментоядерные

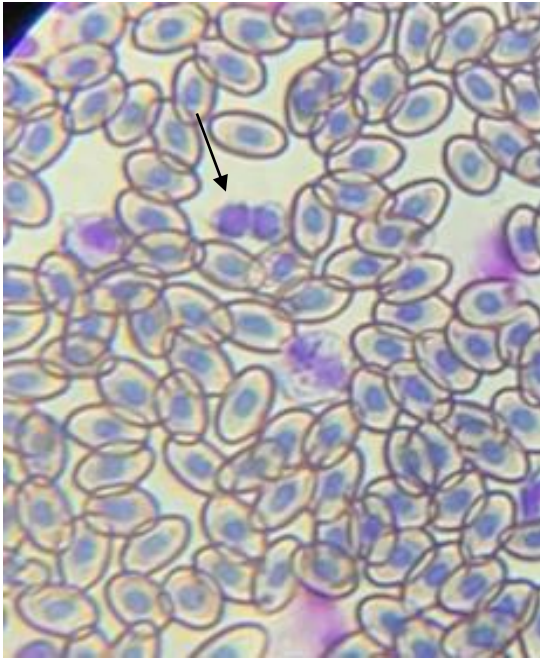
### **Базофилы**

Клетки круглой формы. Ядро зрелого базофила имеет несколько сегментов, окрашивается в тёмно-фиолетовый цвет (молодые клетки имеют ядро округлое, вытянутое, палочковидное). Протоплазма мелкозернистая. Гранулы тёмно-фиолетовые (рисунок 5).

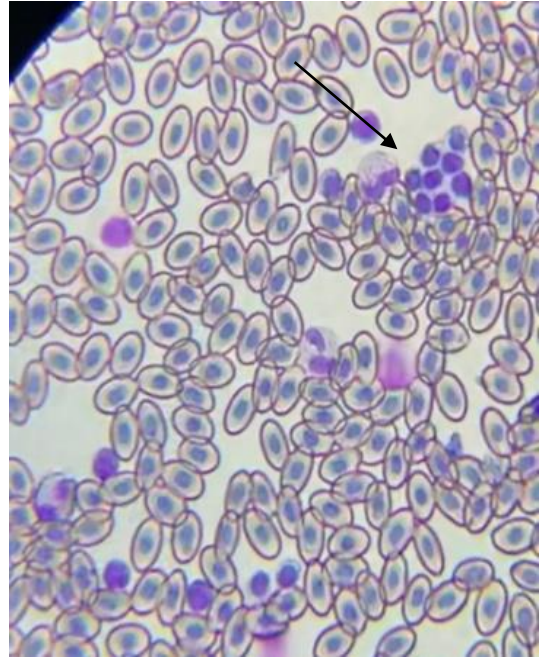
### **Эозинофилы**

Круглые клетки (рисунок 6). Ядра по форме как у базофилов. Окрашиваются в тёмно-фиолетовый цвет с розовыми круглыми гранулами.





**Рисунок 5. – Базофил**



**Рисунок 6. - Эозинофил**

### **Псевдоэозинофилы**

Различают:

- а). С круглыми гранулами (юные формы), которые напоминают эозинофилы, но крупнее их и края гранул кажутся несколько размытыми, окрашиваются в красный цвет; ядра имеют менее рельефный рисунок и окрашиваются менее интенсивно, чем у эозинофилов;
- б). В подавляющем большинстве с палочковидной грануляцией в протоплазме. Гранулы окрашиваются более интенсивно, чем у псевдоэозинофилов с круглыми гранулами, и ядра их более пикнотичны, иногда имеются два ядра, расположенных у полюсов клетки.

### **Лимфоциты**

Клетки величиной 5-10 мкм, ядра круглые, окрашиваются в тёмно-фиолетовый цвет. Протоплазма синего цвета, иногда содержит азурофильные зёрнышки.

Сравнивая данные лейкоцитарной формулы наших исследований с литературными данными, можно отметить, что в крови птиц, которые находятся в виварии КГУ, имеется 3 вида лимфоцитов (рисунок 7):

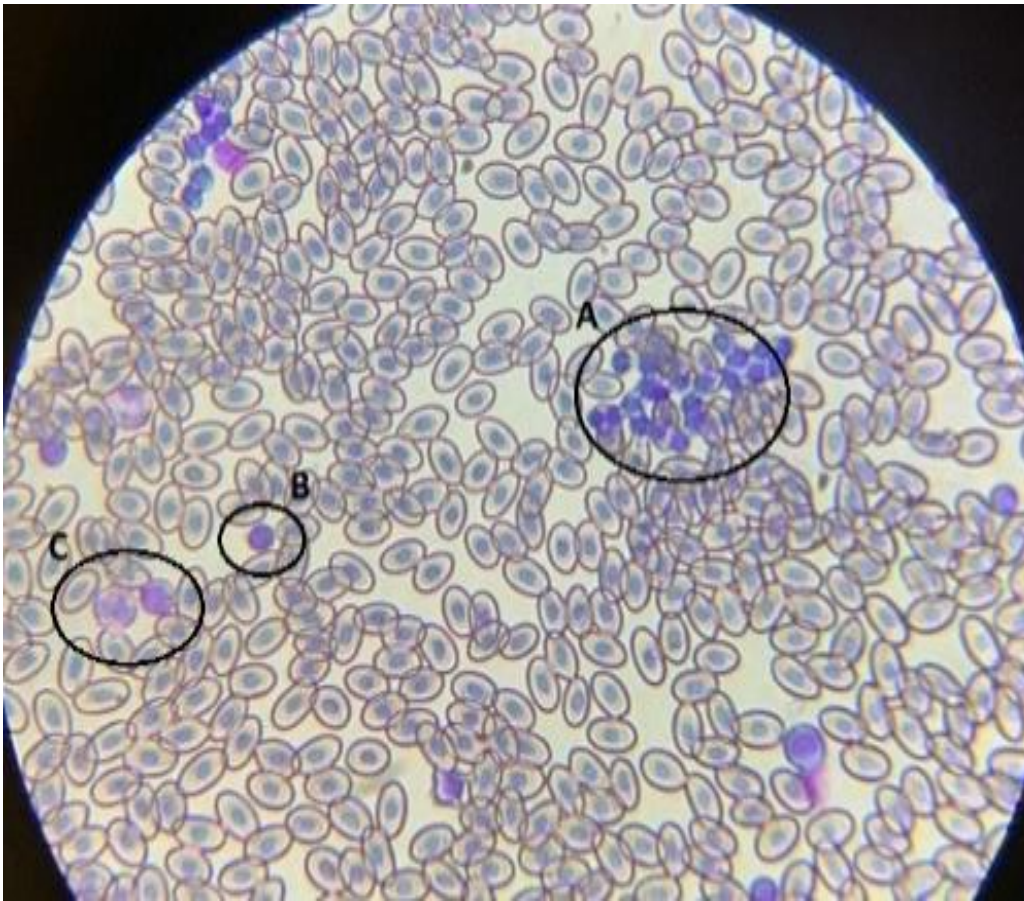
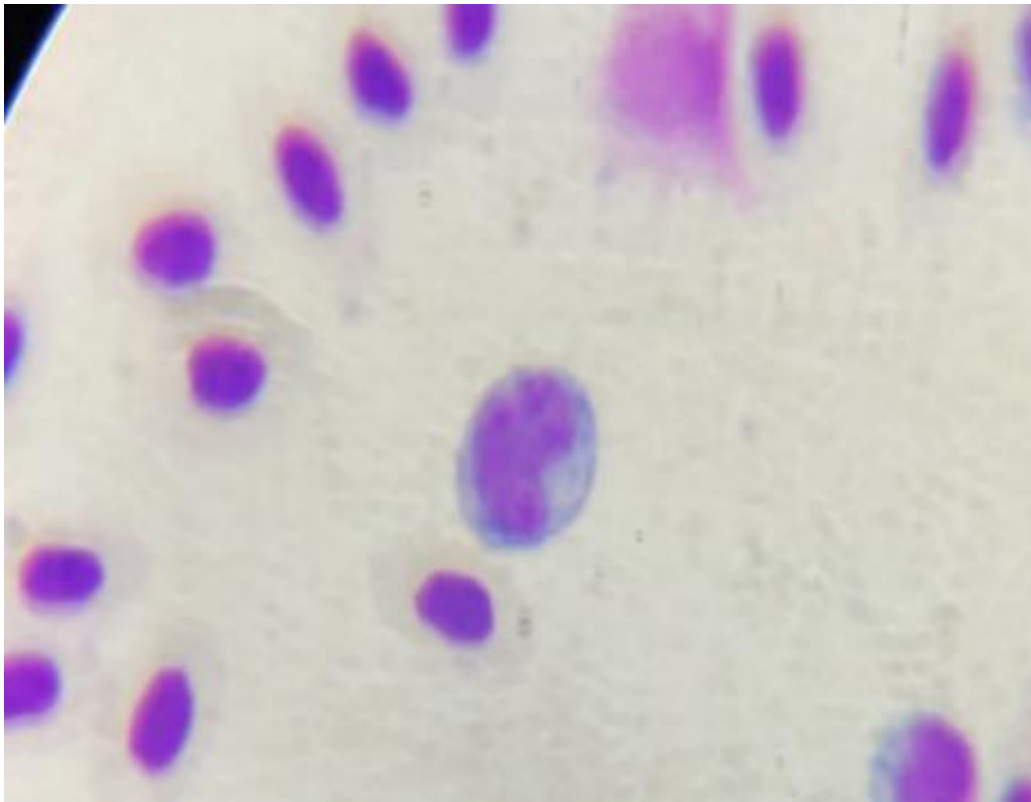


Рисунок 7 – Лимфоциты: А – малые; В – средние; С – большие.

Как видно из рисунка 7 лимфоциты отличаются по размерам и по соотношению ядра и цитоплазмы. Соответственно, малых лимфоцитов  $15\pm 3\%$ , средних  $8\pm 3\%$ , и больших  $11\pm 2\%$ .

#### **Моноциты**

Величина клеток 11-14 мкм. Протоплазма их серовато-голубая, окружает ядро широким слоем, азурофильная зернистость – пылевидная (рисунок 8). Ядро бобовидной или лопастной формы фиолетово-дымчатого цвета.



**Рисунок 8. – Моноцит.**

### **Относительная плотность крови**

Увеличение относительной плотности крови бывает при сгущении ее (диарея, рвота, полиурия, лихорадка, непроходимость кишечника, нефрит и др.), а уменьшение - при анемиях, гемолитической желтухе, гидремии (разжижении крови вследствие обильного приема воды). У здоровых птиц относительная плотность крови колеблется в следующих пределах (г/см<sup>3</sup> или в единицах СИ, кг/л): куры 1,039 – 1,057; (1,050 – 1,058).

### ***Определение относительной плотности цельной крови, плазмы и сыворотки по методу Филиппса***

Готовят насыщенный раствор меди сульфата, для чего 900 г меди сульфата 5-ти водного растирают в мелкий порошок, приливают 1250 мл дистиллированной воды и стеклянной палочкой тщательно взбалтывают в течение 5 мин. Измеряют температуру раствора с точностью до 0,5°С и немедленно сливают его с осадка, а затем фильтруют. Из полученного раствора готовят основной стандартный раствор относительной плотностью 1,100. С этой целью берут 529 мл основного раствора с температурой 15°С и доводят дистиллированной водой до 1 л. Из основного стандартного раствора готовят рабочие растворы меди сульфата, плотностью от 1,030 до 1,075. Для получения этих растворов в мерную колбу отмеряют такое количество стандартного раствора, которое соответствует двум последним цифрам плотности приготавливаемого раствора, уменьшенным на 1 мл, и добавляют дистиллированной воды до 100 мл. Например, при изготовлении раствора плотностью 1,050 берут 49 мл (50-1) основного стандартного

раствора и добавляют воды до 100 мл. Растворы хранят в темных флаконах, закрытых пробками.

В пипетку набирают испытуемую кровь и переносят в пробирку, содержащую один из рабочих растворов меди сульфата, и осторожно, располагая кончик пипетки в 1 см над уровнем раствора, выпуская одну каплю крови. Капля опускается на глубину 2 – 3 см и затем или начинает погружаться глубже (плотность крови больше плотности раствора), или подниматься (плотность крови меньше плотности раствора). Таким образом, находят раствор, в котором капля остается во взвешенном состоянии: в этом случае плотность крови будет соответствовать плотности раствора.

**Проточная цитометрия** является объективным методом количественного анализа и используется в автоматизированной диагностике патологических процессов на основе регистрации отклонений от нормы общего содержания ДНК в клетке. Проточный цитометр осуществляет распределение клеток, находящихся в различных фазах клеточного цикла. Для этого суспензия предварительно окрашенных флуорохромом клеток подается в измерительную камеру прибора, где в плоскости фокусировки ртутно-кварцевой лампы и луча лазера измеряется интенсивность флуоресценции и светорассеяние клеток.

После компьютерной обработки получаемых сигналов, на дисплее ЭВМ получается распределение клеток по их размерам и ДНК-гистограммы. Широкое распространение проточная цитометрия нашла в изучении пролиферативной активности клеток. Для выявления пролиферативного пула клеток в периферической крови пользуются реактивом из альфа-нафтилбутирата, 0,1 молярного раствора фосфатного буфера и проточного синего ББ. Мазки крови высушивают на воздухе и фиксируют в парах формалина в течение 4 минут. На поверхность мазков наносят свежеприготовленный реактив и инкубируют в темноте в течение 30 минут. Затем промывают дистиллированной водой и высушивают на воздухе.

**Исследование клеток костного мозга** Для получения костномозгового пунктата костный мозг при помощи резинового баллона выдувают из проксимальной трети бедренной кости цыпленка (курицы) на часовое стекло.

Для приготовления мазков костного мозга полученное содержимое бедренной кости в смеси 1:1 с физиологическим раствором наносят на предметное стекло и растирают шлифованным стеклом в виде тонкого слоя. С целью предохранения свертывания костномозгового пунктата и уменьшения деформации клеток мазки делают на слегка подогретых предметных стеклах. Окраску мазков проводят по Нохту. Подсчет миелограммы осуществляют на 500 или 1000 клеток.

#### ***Окраска мазков по Нохту***

##### **Реактивы.**

1. Растворяют 1г азура II в 1литре дистиллированной воды.
2. Растворяют 1 г водорастворимого желтого эозина в 1литре дистиллированной воды.

Каждый из этих растворов хорошо перемешивают и оставляют созревать при ежедневном встряхивании на 10-14 дней. Перед окрашиванием раствор краски готовят смешиванием 25 мл первого раствора (0,1 % раствора азура II), 20 мл второго раствора (0,1% раствора эозина) с 55 мл нейтральной дистиллированной воды.

#### Методика.

Краску наливают на фиксированный мазок и окрашивание длится в зависимости от температуры воздуха 25-45 минут. Затем мазки смывают водой и высушивают на воздухе.

Контрольные вопросы:

3. Как определить количество эритроцитов в крови?
4. Описать окраску мазков по Нохту?
5. Определение относительной плотности цельной крови, плазмы и сыворотки по методу Филиппса?
6. Дать определение гематокрита?
7. Объяснить суть метода «проточная цитометрия»?
8. В каких случаях повышается относительная плотность крови?
9. Классификация псевдоэозинофилов?
10. Определение и основная функция гемоглобина; по какой формуле производят расчет гемоглобина?
11. Что различает эритроциты и тромбоциты птиц от эритроцитов и тромбоцитов животных?
12. В какой цвет окрашиваются лимфоциты?

## **6. БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Биохимические процессы протекают при непосредственном участии строго специфических для каждой биохимической реакции ферментов и гормонов. Все процессы обмена взаимосвязаны. Изменения их интенсивности и направленности в звеньях одного обмена отражаются на всех других видах обмена. При сложной и тесной взаимосвязи всех видов обмена существует общебиологическая закономерность: обеспечение основных жизненных функций выполняют нуклеиновый и белковый обмены. Углеводный и липидный обмены обеспечивают энергетические и пластические реакции. Витамины, макро-, микро-элементы участвуют в создании фона кислотно-щелочного баланса среды и образуют огромный перечень биологически активных веществ. Биохимические исследования даже на ранних стадиях заболевания выявляют обширные и разнообразные отклонения во всех видах обмена веществ. Сложность борьбы с нарушениями обмена веществ в организме заключается в том, что до сих пор нет четко отработанных методов диагностики этих расстройств и дифференциальной диагностики их от других незаразных болезней. Своевременная диагностика нарушений обменных процессов и их коррекция способствуют предупреждению и раннему лечению многих заболеваний

животных и птиц, повышают сопротивляемость организма к неблагоприятным факторам внешней среды.

### **Общий белок и белковые фракции**

Определение общего белка в сыворотке крови даёт представление об уровне белкового питания и помогает диагностировать гепатопатию и нефропатию. Отклонения уровня белка от нормы свидетельствует о глубоких нарушениях обмена веществ в организме. Концентрация общего белка в сыворотке зависит главным образом от синтеза и распада двух основных белковых фракций — альбумина и глобулинов. Физиологическая роль белков крови многогранна:

- поддерживают коллоидно-осмотическое давление, сохраняя объем крови, снижая воду и задерживая ее, не позволяя выходить из кровеносного русла;

- принимают участие в процессах свертывания крови;

- поддерживают постоянство рН крови, являясь одной из буферных систем крови;

- поддерживают нормальный уровень катионов — кальция, железа, меди, магния в крови, образуя с ними недиализируемые соединения;

- служат резервом аминокислот;

- выполняют регулирующую функцию, входя в состав гормонов, ферментов и других биологически активных веществ.

Снижение общего белка (гипопротеинемия) отмечают при длительном недокорме птиц (белковом голодании), хронических расстройствах ЖКТ, из-за чего плохо усваивается протеин при нефрите и нефрозе, циррозе печени, других болезнях, а также при дефиците углеводов, макро- и микроэлементов, витаминов в рационе.

Повышение (гиперпротеинемия) бывает при высококонцентратном типе кормления (белковый перекорм), токсикозах и других болезнях, сопровождающихся дистрофией при тяжелых формах диареи, дегидратации организма, острых воспалительных процессах, сепсисе, при заболевании печени (гепатиты, дистрофия).

### ***Определение общего белка рефрактометрическим методом***

#### **Принцип метода.**

В основе метода лежит способность сыворотки крови преломлять проходящий через неё свет. Коэффициент преломления соответствует содержанию белка в сыворотке крови.

#### **Реактивы.**

1. Спирт этиловый 96% (ректификат).

2. Вода бидистиллированная.

Количество необходимых реактивов на 100 анализов

1. Спирт этиловый- 200 мл.

2. Вода бидистиллированная - 10 мл.

#### **Специальное оборудование.**

1. Рефрактометр.

2. Унипипетка на 50 мкл и наконечники к ней.

3. Салфетки из бязи или батиста.

4. Материал для исследования

Материалом для исследования служит сыворотка крови, свободная от гемолиза.

#### Ход определения.

Перед началом работы проверяют правильность установки рефрактометра на ноль, для чего выполняют следующие операции:

- установить рефрактометр против источника света, открыть зеркало шкалы коэффициентов преломления и осветительное окошко верхней призмы, отрегулировать равномерность освещения поля зрения;

- открыть измерительную призму и протереть её салфеткой, смоченной спиртом (расход спирта 0,5 мл на пробу); -нанести на нижнюю измерительную призму несколько капель воды, закрыть крышку призмы;

-ручкой, расположенной справа ,установить окрашенность границы светотени (контрастность);

- ручкой, расположенной слева, установить вертикальную линию в нижней части поля зрения окуляра на коэффициент  $n = 1,3330$  (точно!), далее специальным ключом из комплекса ЗИП прибора вращают регулировочный винт до установки границы линии светотени на середину креста в верхней части поля зрения;

- проверяют правильность установки.

Протирают призму салфеткой, смоченной спиртом и затем сухой. Наносят на нижнюю призму 50 мкл сыворотки крови, закрывают призму, ручкой, расположенной на рефрактометре слева, устанавливают границу светотени в середине креста и по нижней шкале снимают показания.

Измерение повторяют 2-3 раза.

#### Расчет результатов.

Производят по таблице Рейса, концентрацию белка выражают в г/л.

Содержание общего белка в сыворотке крови определяют также по биуретовой реакции.

Принцип метода состоит в том, что белки реагируют в щелочной среде с сернокислой медью с образованием соединений фиолетового цвета.

#### ***Определение белковых фракций***

Исследование отдельных фракций белка имеет большое диагностическое значение, так как дает возможность выявить патологию, при которой содержание общего белка сыворотки крови существенно не изменяется. Уменьшение альбуминов отмечают при острых воспалительных процессах, нефритах, гепатитах. Для цирроза печени характерно снижение альбуминов и резкое увеличение  $\gamma$ -глобулинов. Увеличение уровня альбуминов отмечают при обезвоживании. Снижение всех фракций – при массивной потере белка через кишечник. Изменение белковых фракций обуславливает диспротеинемию, выражением которой является белковый коэффициент (отношение количества альбуминов к сумме глобулинов). В норме оно составляет 0,9:1,4

### Принцип метода.

Компоненты белковой смеси мигрируют в электрическом поле (в геле агарозы или агара) в направлении и со скоростью, зависящей от заряда их молекул и влияния электроэндоосмоса. В результате смесь делится на фракции, которые можно выявить и измерить количественно.

### Реактивы.

1. Веронал-мединаловый буфер рН=8,6 (9,3 г веронала и 51,5 г мединала растворяют в 2 л дистиллированной воды, через сутки буферный раствор профильтровать и развести в 2 раза).

2. 1%-ный раствор агарового геля (1 г агара растворяют в 100 мл веронал-мединалового буфера рН=8,6 и выдерживают на кипящей водяной бане 2 часа, затем охлаждают гель до 50° С и выдерживают в термостате 1 час при температуре 50° С для выравнивания температуры геля).

3. 20%-ный раствор уксусной кислоты (400 г ледяной уксусной кислоты растворяют в 2 л дистиллированной воды).

4. Фиксирующий раствор (300 мл этилового спирта и 100 мл 20%-ного раствора уксусной кислоты). Раствор для окраски гелей (1 г бромфенолового синего, 500 мл этилового спирта, 100 мл ледяной уксусной кислоты и 400 мл дистиллированной воды).

6. 7%-ный раствор уксусной кислоты (140 г ледяной уксусной кислоты растворяют в 2 л дистиллированной воды).

7. 0,25 н раствор КОН.

### Оборудование и аппаратура.

1. Прибор для электрофореза.
2. Источник постоянного тока.
3. Дозатор.
4. Весы аналитические.
5. Термостат.
6. Водяная баня.
7. Холодильник бытовой.
8. Предметные стекла.
9. Спектрофотометр.
10. Кюветы для фиксации и окраски гелей со штативом-контейнером.
11. Пипетка на 2 мл.
12. Унипипетка на 10 мкл и наконечники к ней.
13. Хроматографическая бумага.
14. Пробирки Флоринского.
15. Бумага фильтровальная.

### Материал для исследования.

Материалом для исследования служит сыворотка крови, без следов гемолиза.



### Ход определения.

Прежде чем приступить к работе, необходимо ознакомиться с инструкцией по эксплуатации прибора. Предметные стекла, на которые наносят слой 1%-ного раствора агарового геля, должны быть чисто вымыты и обезжирены. После застывания геля на пластинках вырезают один резервуар. Вырезанный агаровый гель удаляют из лунки осторожно.

1. В универсальную разделительную камеру помещают веронал-мединаловый буфер  $pH=8,6$  в количестве 5,5 литров. На охлаждающую пластинку помещают предметные стекла в количестве 10 штук. На стекла с гелем кладут хроматографическую бумагу и замыкают цепь. В вырезанные лунки вносят по 10 мкл сыворотки крови. Закрывают камеру крышкой и пропускают ток 4 мА на 1 стекло. Продолжительность электрофореза 40 минут.

2. Стекла с гелем фиксируют в течение 1 часа. После фиксации гелевые пластинки окрашивают в течение 1 часа раствором красителя. После этого пластинки в течение 12 часов отмывают от избытка красителя 7%-ным раствором уксусной кислоты, несколько раз меняя раствор, до исчезновения фона.

3. Гелевые пластинки, содержащие отдельные фракции, вырезают и помещают в пробирки, содержащие

4. мл 0,25 н раствор КОН для элюирования. Через 12 часов определяют оптическую плотность содержимого пробирок при  $\lambda=530$  нм.

Расчет результатов. При расчете результатов определяют сумму экстинкций всех фракций, принимая за 100%, и вычисляют долю каждой фракции.

Контрольные вопросы:

1. Опишите физиологическую роль белков в крови?
2. Что служит материалом для исследования на общий белок и белковые фракции?
3. Опишите принцип рефрактометрического метода?
4. Какую таблицу используют для расчета результатов рефрактометрического метода?
5. В чем заключается сложность борьбы с нарушениями обмена веществ в организме?
6. Что обуславливает изменение белковых фракций в организме?
7. Принцип метода определения белковых фракций?

## **7. ПОКАЗАТЕЛИ ЕСТЕСТВЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ОРГАНИЗМА ПТИЦ**

Существуют возрастные особенности формирования естественной резистентности птиц. Реактивные свойства в растущем организме складываются постепенно и окончательно формируются лишь на

определенном уровне общефизиологического созревания. Постнатальный период развития птиц характеризуется состоянием пониженной реактивности организма, выражающейся слабым проявлением неспецифических гуморальных факторов, недостаточной защитной силой кожно-перьевого покрова и слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта. По мере развития реактивность организма птиц постепенно усложняется и совершенствуется, что связано с развитием желез внутренней секреции, формированием определенного уровня обмена веществ, совершенствованием защитных приспособлений против инфекций, интоксикаций и. т.д. (Л.Н. Соколова, 1989, А.Ю. Бакулин, 1994, Б.А. Гладков, 1990).

**Лизоцим** имеется почти во всех тканях и органах птицы. Максимальные количества лизоцима определяются в лейкоцитах, минимальные в сыворотке. Лизоцим помимо бактериостатического действия выполняет роль регулятора клеточной дифференциации, а также повышает эффективность системы комплемента и пропердина.

**Определение активности лизоцима фотоэлектроколориметрическим методом по Дорофейчуку А.Г. с изменением температурного режима реакции сыворотки крови кур с культурой *M. lisodecticus*.**

Принцип метода.

Метод основан на изменении оптической плотности среды в результате способности лизоцима крови лизировать тест-культуру *M. lisodecticus* в фосфатном буфере.

Оборудование.

1. Фотоэлектроколориметр.
2. Термостат при 39° С.
3. Водяная баня при 56° С.
4. рН-метр.
5. Колбы мерные-100 мл.
6. Воронки.
7. Пробирки обычные.
8. Пипетки на 1, 2 мл. **Реактивы.**

1) Фосфатный рабочий буфер (рН=7,4):

а) калий фосфорнокислый однозамещенный ( $KH_2PO_4$ ) - 0,9078 г растворяют в мерной колбе на 100 мл, получают 1/15 М, раствор  $KH_2PO_4$ ;

б) натрий фосфорнокислый двузамещенный  $NaHPO_4$  - 0,9476 г на 100 мл бидистиллированной воды - получают 1/15М раствора  $NaHPO_4$ . Для приготовления рабочего буфера смешивают 28 мл 1/15 М раствора  $KH_2PO_4$  и 72 мл 1/15М раствора  $NaHPO_4$ .

Ход определения.

В подготовленные для анализа пробирки вносят микропипеткой по 0,03 мл сыворотки крови, после чего штатив с пробамы ставят в водяную баню  $t=56^\circ C$  на 30 минут для инактивации комплемента (который влияет на ход реакции). Затем пробамы дают остыть, далее в каждую из них вносят пипеткой по 1,47 мл смыва стандартной тест-культуры. Содержимое пробирок

встряхивают, ставят в термостат (инкубуруют) при 39° С на 45 минут. Замер экстинкции исследуемых проб производят при том же режиме, что и при стандартизации культуры:

Расчет активности лизоцима.

Из числа оптической плотности исследуемой пробы вычитают показатель плотности микробной взвеси. Полученная величина отражает активность лизоцима сыворотки крови, или % лизиса.

$$\text{Формула: } A = \frac{(D_0 - D_1) * 100}{D_0} - \frac{(D_{\text{ко}} - D_{\text{к}}) * 100}{D_{\text{ко}}}, \quad (3)$$

где  $D_0$  - оптическая плотность содержимого опытных кювет до инкубации;

$D_1$  - оптическая плотность содержимого опытных кювет после инкубации;

$D_{\text{ко}}$  - оптическая плотность содержимого контрольных кювет до инкубации;

$D_{\text{к}}$  - оптическая плотность содержимого контрольных кювет после инкубации.

**Комплимент** представлен комплексом сывороточных белков глобулиновой природы, который рассматривается как система проэнзимов. Это сложная эффекторная система белков сыворотки, играющая важную роль в регуляции иммунного ответа и в поддержании гомеостаза.

**Определение комплементарной активности сыворотки крови птиц по методике Густова А.В. с изменением температурного режима сыворотки крови кур (39 °С вместо 37 °С)**

Метод определения комплемента основан на способности комплемента в комплексе антиген-антитело вызывать гемолиз сенсibilизированных эритроцитов. Активность комплемента определяют в процентах гемолиза, для чего показания экстинкции исследуемой пробы делят на показания экстинкции контрольной пробы и выражают в процентах.

Оборудование.

1. Фотоэлектроколориметр.
2. Термостат при 39°С.
3. Центрифуга.
4. Пробирки центрифужные.
5. Пипетки на 0,1; 1; 2; 5; 10 мл.
6. Колбы конические.
7. Стаканы химические.
8. Колбы мерные на 250, 500, 1000 мл.

Реактивы.

- 1) Буферные растворы:

А) Основной веронал-мединаловый буфер (рН 7,4) следующего состава: веронал-2,875 г, мединал- 1,875 г, хлористый натрий- 42,5г, бидистиллированная вода до 1 л.

Б) Рабочий веронал-мединаловый буфер приготавливают в день исследования из основного, прибавляя к части последнего 4 части бидистиллированной воды. В) 0,85% раствор хлористого натрия.

Г) Гемолитическая сыворотка.

#### Приготовление стандартной взвеси эритроцитов барана.

Кровь получают у барана из яремной вены. Дефибринируют ее путем встряхивания с бусами в стерильной посуде в течение 10 мин. Затем эритроциты отмывают рабочим буфером (2-3 раза) путем центрифугирования при 2 тыс. об/мин. 10 минут до получения прозрачной надосадочной жидкости. Концентрацию эритроцитов доводят до 3%. В зависимости от количества проб по таблице подбирают объём эритроцитов и буфера. Полученную взвесь стандартизируют с помощью ФЭК с использованием зеленого светофильтра и кювет на 10 мм, для чего к 1 мл 3%-ной взвеси эритроцитов добавляют 9 мл бидистиллированной воды, колориметрируют против контроля, состоящего из 1 мл буфера и 9 мл бидистиллированной воды.

Отсчет экстинкции ведут по красной шкале 3%-ная взвесь эритроцитов соответствует коэффициенту экстинкции меньше чем 0,40, то к исходной взвеси эритроцитов добавляют по каплям эритроциты и наоборот разбавляют буфером, если экстинкция более 0,40.

#### Приготовление гемолитической системы.

Гемолитическая сыворотка готовится в производственных условиях и используется для работы с титром не ниже 1:1200. Для реакции гемолиза гемолитическую сыворотку разводят в четыре раза. Например: титр гемолиза 1:1200, расчет делают путем деления  $1200 / 4 = 300$ , таблица 1.

Далее рассчитывают количество гемолитической сыворотки по числу исследуемых проб. Для приготовления гемсистемы гемолитическую сыворотку соединяют с 3%-ной взвесью эритроцитов в отношении 1:1. В пробирки наливают по 3 мл рабочего буфера, 0,15 мл исследуемой сыворотки и 2 мл гемсистемы. Смесь тщательно перемешивают и ставят в термостат при  $t = 39^{\circ}\text{C}$  на 45 минут, после чего центрифугируют на при 2000 об/мин. в течение 10 минут. Далее определяют оптическую плотность надосадочной жидкости исследуемых и контрольных проб на ФЭКе. Условия фотоэлектроколориметрирования соблюдаются те же, что и при измерений оптической плотности эритроцитарной взвеси. Контролем служит смесь, состоящая из 2 мл гемсистемы и 3 мл бидистиллированной воды.

Активность комплемента определяют в процентах гемолиза, для чего показания экстинкции исследуемой пробы делят на показания экстинкции контрольной пробы и выражают в процентах:

$$\% \text{ гемолиза} = \frac{\text{Экстинкция исследуемой пробы} * 100}{\text{Экстинкция контрольной пробы}} \quad (4)$$

Таблица 1. - Расчет комплементарной активности сыворотки крови:

Общий объем взвеси, мл	Количество эритроцитов, мл	Количество буфера, мл
13,0	0,33	12,67
14,0	0,35	13,65
15,0	0,38	14,62
16,0	0,40	15,6
17,0	0,43	16,57
18,0	0,45	17,55
19,0	0,48	18,52
20,0	0,50	19,5
21,0	0,53	20,47
22,0	0,55	21,45
23,0	0,58	22,42
24,0	0,60	23,4
25,0	0,63	24,37
26,0	0,65	25,35
27,0	0,68	26,32
28,0	0,70	27,3
29,0	0,73	28,27
30,0	0,75	29,25
31,0	0,78	30,22
32,0	0,80	31,2
33,0	0,83	32,17

**Пропердин** представляется белком типа глобулина, состоящим из четырех субъединиц. Из наиболее примечательных свойств пропердина является его уникальная способность отражать напряженность врожденного иммунитета, состояние общей резистентности.

*Определение содержания пропердина в сыворотке крови кур по методике Phordle (1966) в модификации (Колбаской Л.С.)*

Модификация метода включает следующее:

1. Работу проводят только со свежей сывороткой в день взятия крови;
2. Строго соблюдают температурный режим ( $t = +4^{\circ} \text{C}$ ), для чего реактив хранят в холодильнике и ход исследования ведут при указанной температуре;
3. Осадок омывают трижды в случае использования сыворотки крови цыплят, учитывая низкое содержание в ней общего белка, и пять раз при работе с сывороткой взрослой птицы.

Принцип метода.

В основу метода заложена реакция между пропердином и зимозаном. Биологическая активность системы пропердина проявляется в определенных температурных условиях, РН, ионной силы среды, при наличии компонента

и ионов магния. Максимальная активность наблюдается при температуре  $t = 4^{\circ}\text{C}$ , при  $\text{pH} = 6,5-7,5$  и ионной силе  $0,05-0,18$ .

#### Оборудование.

1. Пробирки на 5-10 мл.
2. Пипетки на 1,2,5,10 мл.
3. Штатив пробирочный
4. Термостат
5. ФЭК.
6. Центрифуга.
7. Холодильник.

#### Реактивы.

1. Сложный буфер (pH 7,4) следующего состава: веронал-2,875 г, мединал - 1,875 г, хлористый натрий- 42,5 г, хлористый магний 2,5 г, хлористый кальций (безводный)- 0,75г. В небольшом количестве горячей воды растворяют веронал и мединал, затем последовательно добавляют все остальные компоненты и объем раствора доводят до 1 литра.

2. 0,015М раствор хлористого магния (0,1685 г хлористого магния растворяют в 100 мл воды).

3. 0,9%-ный NaCl (физиологический раствор).

4. *Зимозан*. 100 мг зимозана помещают в стеклянный бюкс, заливают 10 мл физиологического раствора. Препарат активируют в кипящей водяной бане в течение часа, затем центрифугируют 30 минут при 4000 об/мин. Надосадочную жидкость сливают, осадок растворяют в сложном буфере, взятом в количестве, равном первоначальному объему физиологического раствора.

5. Набор реактивов для определения белка по Лоури.

Все реактивы хранят в холодильнике.

#### Ход определения.

В пробирку на 5 мл внести последовательно 0,1 мл свежей сыворотки, 0,1 мл охлажденного сложного буфера, 0,1 мл хлористого магния и 0,2 мл зимозана. Смесь тщательно размешивают и оставляют на 1 час при температуре  $+ 4^{\circ}\text{C}$ . Через час добавляют 1 мл сложного буфера и центрифугируют 5 минут при 6000 об/мин. Полученную после центрифугирования жидкую фазу удаляют, а осадок отмывают три - пять раз холодным физиологическим раствором, добавляя по 2 мл последнего. После каждого прибавления физиологического раствора осадок тщательно размешивают, затем смесь центрифугируют. В полученном осадке определяют количество белка методом Лоури. Для этого к осадку приливают 4 мл реактива «С», через 15 минут - 0,4 мл реактива «Е» (реактив Фолина, взятый в отношении 1:1с дистиллированной водой). Смесь встряхивают и оставляют на 1 час. Затем вновь тщательно размешивают осадок стеклянной палочкой и центрифугируют 5 минут при 6000об/мин, до получения прозрачного раствора. Колориметрируют против контроля, состоящего из 4 мл реактива «С», 0,4 мл реактива «Е» и 2 мл дистиллированной воды при красном светофильтре в кювете 5 мл. Для исключения влияния остаточного

белка, содержащегося в зимозане, ставят 2-3 контрольные пробы, в которые вместо сыворотки добавляют физиологический раствор. Обработка контрольной пробы проводится так же, как и опытной. Количество белка рассчитывают по калибровочной кривой, при этом по разнице опытных и контрольных проб судят о количестве белка, адсорбирующегося на зимозан.

**Бета-лизины** являются биологически активными веществами гипофизарно-гипоталамического происхождения. Основное их депо тромбоциты, при разрушении которых начинает проявляться действие бета-лизинов.

**Определение активности бета-лизина в сыворотки крови птиц фотоэлектроколориметрическим методом по Бухарину О.В., Фролову В.А., Луда А.П., 1972**

Метод определения основан на изменении оптической плотности среды в результате способности сыворотки лизировать тест-культуру *V. Subtilis* в растворе сахарозы. Активность бета-лизинов выражают в % от лизиса.  
Оборудование.

1. Фотоэлектроколориметр.
2. Термостат
3. Водяная баня.
4. Пробирки.
5. Пипетки на 1, 5, 10 мл.
6. Воронки.
7. Стерильная марля.

Реактивы.

1. Бидистиллированная вода.
2. 0,75 М. раствор сахарозы: 256,73 г сахарозы растворяют бидистиллированной водой в мерной колбе емкостью 1 л, кипятят в течение 10 минут, затем колбу закрывают ватно-марлевой пробкой.

Приготовление стандартной суточной культуры.

Работу проводят с культурой *V. Subtilis*, полученной в Гос. НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Тарасевича Л. А. Суточную агаровую тест-культуру (10-15 пробирок посева) смывают 0,75М раствором сахарозы при pH = 6,2 до получения взвеси, густота которой соответствует оптической плотности 0,50 экстинкции, кювета -3 мм против зеленого светофильтра, контроль - раствор сахарозы). Перед снятием показания ФЭКа полученную смесь фильтруют через 2 слоя стерильной марли.

Ход определения.

В три пробирки отмеряют по 0,2 мл испытуемой сыворотки и обозначают: 1 пробирка (контроль) - «К», 2-я пробирка (показатель оптической плотности до термостатирования) - «Д1», 3-я пробирка (показатель оптической плотности после термостатирования) - «Д2». Все три пробирки ставят на водяную баню при  $t=56^{\circ}\text{C}$  на 30 минут. Далее в опытные пробирки «Д1» и «Д2» наливают по 0,4 мл полученного смыва культуры и встряхивают. Пробирки «Д2» помещают в термостат на 2 часа при  $t=39^{\circ}\text{C}$ ,

после чего в. опытные пробирки «Д1» и «Д2» добавляют по 0,6 мл раствора сахарозы, а в пробирку «К» -1 мл раствора сахарозы для совладения общего объема. Затем все пробирки (опытные и контрольные) встряхивают и производят замер экстинкции на ФЭК. Измерение оптической плотности проб производят против соответствующего им контроля.

#### Расчет активности бета-лизинов.

Активность бета-лизинов выражают в % лизиса и вычисляют по формуле 5:

$$X = \frac{D1 - D2 * 100}{D1} \quad (5)$$

где X - % лизиса,

D1- показатель оптической плотности пробы до термостатирования,

D2 - показатель оптической плотности пробы после термостатирования,

100 - перевод в проценты.

**Бактерицидная активность сыворотки крови** является интегральным показателем антимикробной активности всех веществ, таких как комплемент, пропердин, бета-лизины, нормальные антитела и др.

Бактерицидную активность сыворотки крови определяют по методу Мишеля Теффера в модификации О.В. Смирновой и Т.А. Кузьминой (1966 г.).

#### Принцип метода.

Метод основан на измерении оптической плотности мясопептонного бульона при росте в нем E.coli с добавлением и без добавления испытуемой сыворотки.

#### Оборудование.

1. Фотоэлектроколориметр.
2. Термостат.
3. Пробирки.
4. Пипетки на 1, 2, 5 мл. Реактивы. Реактивы.
  1. 0,85% раствор хлористого натрия.
  2. Мясо-пептонный бульон.
  3. 24-часовая микробная культура.

#### Приготовление стандартной культуры.

Работа проводится с культурой E.coli , серотип O<sub>1</sub>

Суточную агаровую тест-культуру (5-6 пробирок) смывают физиологическим раствором до получения 2 млрд. взвеси, густота которой соответствует оптической плотности 0,30. Затем 0,01 мл 2 млрд. микробной взвеси вносят в 4,5 мл мясо-пептонного бульона и оставляют в термостате на 24 часа.

#### Ход определения

В пробирки отмеряют 4,5 мл стерильного мясо-пептонного бульона (вместо бульона Хоттингера, как указывают авторы) и 1 мл испытуемой сыворотки. Затем пастеровской пипеткой добавляют по 1 капле суточной 2 млрд. взвеси культуры E.coli (можно использовать микропипетку и вносить по 0,1 мл культуры). Контролем служит пробирка с бульоном и культурой



без сыворотки. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и стерильной пипеткой отбирают по 2 мл для измерения оптической плотности. Смесь помещают в термостат при  $t=39^{\circ}\text{C}$  на 3 часа.

При добавлении к 4,5 мл МПБ 1 капли 24-часовой культуры кишечной палочки оптическая плотность бульона заметно повышается за счет роста внесенных микробов только через 3 часа после инкубации в термостате при  $t=39^{\circ}\text{C}$ . Если культуру выдерживают в термостате дольше, оптическая плотность резко увеличивается, значительно превышая предельные показания на шкале ФЭК. Поэтому рекомендуется проводить повторное измерение оптической плотности через 3 часа.

Таким образом, получают два показателя; первый характеризует исходную оптическую плотность бульона с культурой и сывороткой сразу после смешения и второй - оптическую плотность той же смеси после трех часов инкубации в термостате. При слабой бактерицидности сыворотки оптическая плотность смеси резко возрастает за счет размножения микробов.

#### Расчет бактерицидной активности сыворотки.

Расчет бактерицидной активности сыворотки производят следующим образом, формула 6: определяют, какой процент по отношению к контролю составляет нарастание оптической плотности в опытной пробирке. Для этого разность между показателями второго и первого измерения умножают на 100 и делят на разность между первым и вторым измерением в контроле.

$$\text{Активность} = 100 - \frac{(\text{Д опыта через 3 часа} - \text{Д опыта сразу}) * 100}{(\text{Д контроля через 3 часа} - \text{Д контроля сразу})}, \quad (6)$$

где Д- показание оптической плотности.

В пробирках, в которые добавляют сыворотку, микробы подвергаются бактерицидному и бактериостатическому действию, и оптическая плотность нарастает тем меньше, чем сильнее выражено это действие.

Контрольные вопросы:

1. Расскажите о приготовлении гемолитической сыворотки.
2. Каким методом определяем содержание пропердина в сыворотке крови кур?
3. Чем характеризуется постнатальный период развития птиц?
4. Формула расчёта активности лизоцима.
5. Что такое бета-лизины?

## **8. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Оценка иммунного статуса организма животных и птиц направлена на выявление состояния иммунной системы в норме, а также прогнозирование и диагностику иммунопатологий. Основными клетками иммунитета, осуществляющими связь и взаимодействие всех органов иммунной системы,

являются лимфоциты. Выработка тимусзависимых (Т-лимфоцитов) и бурсозависимых (В-лимфоцитов) является физиологическим процессом, который протекает и при отсутствии антигенной стимуляции, но зависит от поступления стволовых клеток из костного мозга.

В-лимфоциты, включаясь в реакции иммунной системы после контакта с антигеном, пролиферируют и дифференцируются в плазматические клетки, которые продуцируют иммуноглобулины трех классов (А, М и G), являющиеся эффекторами гуморального звена иммунитета. Одним из основополагающих механизмов функционирования системы иммунитета является взаимодействие трех типов клеток - макрофагов, Т и В лимфоцитов. Система макрофагов включает моноциты крови и тканевые макрофаги. Изучение фагоцитоза представляет возможность определения поглотительной способности макрофагов, оценки функционального состояния нейтрофилов и их роли в защитной системе организма птицы. Фагоцитарная активность является основной функцией нейтрофилов в защите организма против микробной агрессии. Нейтрофильные гранулоциты составляют ведущее звено неспецифической антимикробной защиты.

Возрастные (физиологические) ИДС выявляются у старых животных и птиц. Врожденные ИДС обусловлены генетической неспособностью организма осуществлять иммунный ответ. Приобретенные ИДС являются наиболее распространенными и могут проявляться в любом возрасте.

Основные методы оценки иммунного статуса:

1. Определение количества лейкоцитов и подсчет лейкоцитарной формулы (см. гематологическое исследование);
  2. Определение количества Т-лимфоцитов птиц;
  3. Определение количества В-лимфоцитов птиц;
  4. Определение циркулирующих и растворимых иммунных комплексов;
- Определение фагоцитарной активности клеток крови.

***Определение количества Т и В- лимфоцитов в реакции розеткообразования (по И. Ю. Ездаковой, О. М. Чуйко, Е. О. Чадиной, 2008 )***

Метод розеткообразования основан на том, что на поверхности Т лимфоцитов птиц расположены  $CD_2$  – рецепторы, на мембране В-клеток - рецепторы к  $C_3$ -компоненту комплемента. При взаимодействии индикаторных частиц с гомологичными молекулами образуются структуры, имеющие форму розеток. В качестве индикаторных частиц используются эритроциты барана и комплекс зимозана с  $C_3$  – компонентом комплемента.

#### **Выделение мононуклеарных клеток.**

Мононуклеарные клетки (МНК) выделяют из свежевзятой или хранившейся при температуре  $+4^0$  С не более 10-12 час. крови птиц. Для предотвращения свертывания кровь смешивают с антикоагулянтом (раствор гепарина), разводят фосфатным буфером рН 7,2 или физиологическим раствором 1:1.

В пробирку вносят раствор (Histopaque-1077, Sigma), наслаивают разбавленную кровь и центрифугируют в горизонтальном положении при

3000 об /мин в течение 30 мин. На границе раздела фаз отбирают взвесь МНК, разбавляют клеточную суспензию питательной средой RPMI-1640, двукратно центрифугируют при 1000 об/мин по 10 мин. Мононуклеары переносят в пробирку и разводят 4-х кратным избытком среды с 5% фетальной сыворотки (ФС). Взвесь МНК смешивают с равным объемом 0,4% раствора трипанового синего. В камере Горяева подсчитывают количество и жизнеспособность неокрашенных клеток. В реакциях используют суспензию с жизнеспособностью клеток не менее 90%.

#### Реактивы.

- суспензия МНК ( $2-1 \times 10^6$  кл/мл) в 1 мл среды RPMI-1640 с 5% ФС;
- 0,5% -ная суспензия эритроцитов барана (ЭБ) в RPMI-1640 с 5% ФС;
- 0,1% -ный раствор зимозана А с комплементом (ЗС<sub>3</sub>- комплекс).

Равные объемы суспензии МНК, ЭБ и ЗС<sub>3</sub> - комплекса смешивают и инкубируют 20 мин при  $t$  20-22<sup>0</sup> С. Полученную смесь центрифугируют при 1200 об/мин в течение 5 мин, инкубируют 18 час при 10-12<sup>0</sup> С. Клетки фиксируют 0,6 % -ным раствором глютарового альдегида (20 мин), трехкратно отмывают дистиллированной водой, центрифугируют при 1200 об/мин по 5 мин. Суспензию клеток наносят на предметное стекло и препарат фиксируют метиловым или этиловым спиртом 10 мин, окрашивают азур II – эозином в течение 20 мин. Под микроскопом (увеличение 400) подсчитывают не менее 200 лимфоцитов, на поверхности которых обнаруживают от 3 и более эритроцитов барана или частиц зимозана, определяют процент розеткообразующих клеток.

***Теофиллиновый тест (по А. В. Караулову, 2002), выявляющий Т-хелперные клетки.*** Используют раствор теофиллина с рН 7,2. Взвешивают 1,8 мг теофиллина и растворяют его в 1 мл теплой среды для культивирования клеток, при изменении рН добавляют 0,1 N раствор NaOH. Предварительно в суспензию клеток вносят 0,2 мл раствора теофиллина в среде RPMI-1640 (готовится ex tempore) и инкубируют в течение часа при 37<sup>0</sup> С. Последующий ход реакции аналогичен методу розеткообразования. Тфр-РОК - количество розеткообразующих клеток в пробе с теофиллином.

***Определение циркулирующих иммунных комплексов*** Циркулирующие иммунные комплексы – физиологический продукт реакции антиген-антитело, являющийся частью защитных иммунных механизмов и присутствующий при различных инфекционно-воспалительных и незаразных болезнях. Образование иммунных комплексов является одним из компонентов нормального иммунного ответа. Уровень продукции циркулирующих иммунных комплексов отражает фазы развития инфекционно-воспалительного процесса и свидетельствует о взаимосвязи с клиническим течением болезни. Выраженное повышение уровня ЦИК в конце острого и, особенно, в течение хронического заболеваний, свидетельствует о неблагоприятном прогнозе, что обусловлено состоянием активации гуморального иммунитета и персистенцией антигена в крови.

***Принцип метода (по Ю. А. Гриневич и А. И. Алферовой.)*** состоит в селективной преципитации комплексов антиген-антитело в 3,75%-ом

растворе полиэтиленгликоля (ПЭГ) с последующим фотометрическим определением оптической плотности преципитата.

#### Ход определения.

1. В пробирку вносят 0,3 мл испытуемой сыворотки и добавляют 0,6 мл 0,1 М боратного буфера (рН=8,4), тщательно перемешивают и переносят по 0,3 мл в две пробирки. В одну из них приливают 2,7 мл боратного буфера (контроль), а в другую – 2,7 мл 3,75 %-ного раствора полиэтиленгликоля с молекулярной массой 6000 (Loba Feinchemie), приготовленного на 0,1 М боратном буфере (опыт).

2. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и оставляют на 60 минут при комнатной температуре.

3. Затем определяют оптическую плотность преципитата на «Spekol-II» ( $E_{450}$  при длине волны 450 нм), полученного из сыворотки крови после осаждения 3,75% -ным раствором ПЭГ. Вычисляют разность показателей оптической плотности опыта и контроля. Результат умножают на 1000. Получают количество иммунных комплексов в 100 мл сыворотки крови.

4. Результат выражают в единицах оптической плотности ( $E_{450} \times 1000$ ). Боратный буфер: 55 мл 1,24 %-ного раствора борной кислоты + 45 мл 1,9 %-ной буры – доводят дистиллированной водой до 200 мл. 3,5 % ПЭГ: 7% ПЭГ 20 мл +20 мл боратного буфера; 7% ПЭГ: 7 г ПЭГ + 100 мл боратного буфера.

#### ***Определение растворимых иммунных комплексов методом осаждения ПЭГ***

Метод основан на различной растворимости мономеров иммуноглобулинов в составе иммунного комплекса при наличии в среде полиэтиленгликоля (ПЭГ-6000).

#### Реактивы и оборудование.

1. Раствор ПЭГ-6000 (3,5%-ный на боратном буфере – 6,7г  $H_3BO_3$ ; 13,4г  $Na_2B_4C_7 \times 10H_2O$  в 1л, рН 8,4).

2. Биуретовый реактив.

3. Фотоэлектроколориметр.

4. Центрифуга.

#### Ход определения.

1. В центрифужные пробирки вносят 3,5% -ный раствор ПЭГ-6000 в объеме 3 мл и 0,1 мл исследуемой сыворотки крови (хранение при +4 °С), смесь выдерживают при +4 °С в течение двух суток.

2. Пробы центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 минут, надосадов удаляют, а осадок один раз отмывают холодным 3,5% -ным раствором ПЭГ. После удаления надосадка в пробирки вносят 0,5 мл биуретового реактива и оставляют при комнатной температуре на 30-45 минут.

3. Содержание белка в пробе определяют фотометрически по оптической плотности (длина волны – 540 нм, кювета – 1,08 мм), против контрольной кюветы с биуретовым реактивом.

4. Концентрацию ЦИК определяют по калибровочному графику, построенному по стандартному раствору альбумина, используемому в концентрациях от 10 мг/мл и ниже в двукратном разведении. Для этого в ряд пробирок с биуретовым реактивом в объеме 0,5 мл вносят по 100 мкл раствора альбумина каждого из разведений и через 30-45 минут определяют оптическую плотность, соответствующую содержанию белка. Строят калибровочный график, в котором по оси ординат откладывают концентрацию альбумина каждого из разведений, а по оси абсцисс – его оптическую плотность.

**Фагоцитарная активность** Фагоцитарная активность лейкоцитов выражается в процентном отношении участвующих в фагоцитозе лейкоцитов к общему числу подсчитанных нейтрофильных лейкоцитов.

*Для определения опсоно-фагоцитарной реакции рекомендуем применять метод В.М. Бермана и Е.М. Славской (1982) , включающий следующие методические приёмы:*

1) Фагоцитарную функцию клеток куриной крови исследуют по отношению к грамположительному тест-микробу St. Aureus.

2) Густоту микробной взвеси доводят до 2 миллиардов микробных клеток в 1 мл физиологического раствора под контролем оптического стандарта мутности.

3) 4%-ный раствор лимоннокислого натрия, кровь и микробную взвесь берут в отношении 1:1:1.

4) Смесь ингредиентов выдерживают в термостате при 40,5<sup>0</sup> С.

5) Микробную взвесь инактивируют при 70<sup>0</sup> С, в течение 30 минут.

Ход определения.

1. Для определения фагоцитоза необходима свежее взятая стабилизированная кровь (сроком хранения не более 2-х часов). К 0,5 мл стабилизированной крови добавляют 0,5 мл суточной микробной взвеси.

2. Пробирки со смесью ингредиентов выдерживают в термостате при 40,5<sup>0</sup> С в течение 30 минут, через каждые 10 минут пробирки встряхивают.

3. После инкубации центрифугируют и из осадка готовят мазки по общепринятой методике. Окрашивают по Паппенгейму.

4. Фагоцитарную активность выражают в процентном отношении активных, участвовавших в фагоцитозе нейтрофилов к общему числу подсчитанных нейтрофильных лейкоцитов, определяют по формуле 7:

$$ФА = A \cdot 100 / H, \quad (7)$$

где H – общее число нейтрофилов,

A – количество фагоцитированных нейтрофилов (оно может и варьировать),

100 – пересчет в проценты.

**Фагоцитарный индекс** характеризует интенсивность фагоцитоза. Он определяется средним числом фагоцитированных микробов, приходящихся

на один активный лейкоцит. Фагоцитарный индекс. Вычисляется фагоцитарный индекс путем деления числа фагоцитированных бактерий на число активных лейкоцитов.

**Иммуноглобулины** - фракция растворимых сывороточных белков, выполняющих функцию антител, специфических к определенным антигенам (т.е. гуморальных носителей специфичности), которые продуцируются плазматическими клетками. У кур, как и других видов птиц, иммуноглобулины разных классов неоднородны и представлены в виде моно- и полимерных форм. Иммуноглобулины М и G содержатся в виде трех подклассов, а иммуноглобулин А – в виде двух с различными молекулярными массами.

IgG — главный опсонизирующий иммуноглобулин для нейтрофилов и моноцитов. Рецепторы этих клеток осуществляют активацию комплемента, что обуславливает их важнейшую роль в образовании иммунных комплексов антиген-антитело и нейтрализации токсинов.

IgM — эволюционно самый старый класс иммуноглобулинов. IgM синтезируется при первичном иммунном ответе, способен к активации комплемента, служит посредником в цитотоксических реакциях, имеет большое значение в возникновении и поддержании аутоиммунных заболеваний.

IgA - является обычно преобладающим иммуноглобулином секретов (слизистых выделений дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта, слюны). Синтез и функционирование секреторного IgA состоит в агрегации микробов и сорбции их на поверхности эпителиальных клеток с одновременным угнетением размножения микробов, чему способствует лизоцим и в меньшей степени комплемент.

### ***Количественное определение иммуноглобулинов методом радиальной иммунодиффузии по Манчини***

#### **Принцип метода.**

Основан на измерении диаметра кольца преципитации, образующегося при внесении исследуемой сыворотки в лунки, вырезанные в слое агара, в который предварительно внесена моноспецифическая антисыворотка. В стандартных условиях опыта диаметр кольца преципитации прямо пропорционален концентрации исследуемого иммуноглобулина. Содержание иммуноглобулинов определяют относительно стандартной сыворотки крови животных с известной концентрацией иммуноглобулинов.

#### **Реактивы и оборудование**

1. 0,05 М трис-буфер (рН 7,4) или веронал-медианоловый буфер (рН 8,6).
2. Моноспецифические антисыворотки к иммуноглобулинам разных классов.
3. 1,5% агар «Difco» или 1% агароза.
4. Азид натрия или мертиолят.
5. Микрошприцы объемом 1 и 10 мкл.
6. Стеклопластинки (9×12).

7. П-образная рамка (толщина 1 мм).
8. Водяная баня.
9. Термостат.
10. Эксикатор.

#### Ход определения.

1. Между двумя стеклянными пластинами размером 9×12 см заливают расплавленный агар (агарозу) на буфере с предварительно внесенной в него при 50-56 °С моноспецифической антисывороткой в количестве 0,5-1 мл в общем объеме 10 мл.

2. В слое агара с антисывороткой пробойником вырезают лунки диаметром 2-3 мм на расстоянии 15 мм одна от другой. На пластине делают несколько рядов лунок.

3. В лунки первого ряда вносят с помощью микрошприца объем стандартной сыворотки в разведении 1:1-1:16. Лунки следующих рядов заполняют опытными образцами (сыворотка, секрет). Пластинки инкубируют во влажной камере в течение 24 ч в термостате при 37°С для определения IgG и IgA и 48 ч – для IgM. По окончании инкубации измеряют диаметры колец преципитации с точностью до 0,1 мм.

4. Калибровочную кривую строят на полулогарифмической бумаге, где по оси ординат откладывают величину концентрации в мг/мл (г/л) для каждого разведения стандартной сыворотки, а по оси абсцисс откладывают диаметры колец зон преципитации каждого разведения стандартной сыворотки. Подобным образом строят графики для каждого Ig в отдельности.

5. Определение количества Ig в испытуемой пробе (сыворотке, секрете) проводят следующим образом: по оси абсцисс откладывают диаметр кольца преципитации исследуемого препарата и восстанавливают перпендикуляр до пересечения с кривой стандартной сыворотки. Точку пересечения с этой кривой проецируют на ось ординат и определяют количество Ig в мг/мл (г/л).

#### Контрольные вопросы:

1. Биологические материалы для исследования.
2. Какие основные методы исследования оценки иммунного статуса?
3. В чем заключается принцип метода определения циркулирующих иммунных комплексов ( по методу Ю.А.Гриневич и А.И. Алферовой)?

## **9. ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ И СИСТЕМА АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ**

Среди различных классов реакций липидного обмена, процессы перекисного окисления липидов не только играют важную роль в нормальной физиологии и биохимии клетки, но и выступают как универсальное неспецифическое звено механизмов развития различных патологических состояний. Поэтому знание характера реакций перекисного окисления липидов, а также состояния антиоксидантной системы,

регулирующей их течение в условиях действия на организм продуктивных животных экстремальных факторов современной технологии животноводства - необходимый этап исследований, направленных на разработку научно обоснованных методов управления процессами адаптации и комплексной терапии, профилактики и реабилитации наиболее распространенных заболеваний животных и птиц.

Перекисное окисление липидов представляет собой процесс непосредственного переноса кислорода на субстрат с образованием перекисей, кетонов, альдегидов и других соединений. Отличительной чертой этой реакции является ее цепной, самоиндуцирующий характер. Обязательным условием протекания процесса перекисного окисления является наличие в системе свободных радикалов. Свободные радикалы постоянно образуются в организме, и одним из главных поставщиков свободных радикалов являются митохондрии. Во внутреннюю мембрану митохондрии встроены большие ферментные комплексы, между которыми как бы плавают небольшие молекулы коэнзима и цитохрома С. Все эти соединения формируют дыхательную цепь, обеспечивающую процесс биологического окисления - перенос электронов с биологических субстратов на молекулярный кислород. Одновременно с электронами через митохондриальную мембрану происходит и перенос протонов. В результате этих двух процессов образуется вода. При сбоях в функционировании дыхательной цепи вместо воды может образоваться супероксид-ион, способный запустить лавинообразный механизм перекисного окисления. Влияние перекисного окисления липидов (ПОЛ) проявляется в обновлении состава и поддержании функциональных свойств биомембран, участии в энергетических процессах, клеточном делении, синтезе биологически активных веществ. Образующиеся в результате реакций ПОЛ токсины могут внести существенный вклад в повреждение клетки и организма в целом.

Антиоксидантная система защищает ткани от губительного действия свободных радикалов. Три большие группы антиоксидантов входят в антиоксидантную систему. Первичные антиоксиданты действуют путем предотвращения образования новых свободных радикалов. Например, супероксиддисмутаза (СОД) превращает супероксид в перекись водорода, которая реакционно менее активна; глутатионпероксидаза (ГП) превращает перекись водорода и липидные пероксиды в безвредные молекулы до того, как они образуют свободные радикалы; металлосвязывающие белки (ферритин и церуплазмин) ограничивают доступность  $Fe^{2+}$ , необходимого для образования гидроксила.

Вторичные антиоксиданты захватывают свободные радикалы, предотвращая цепные реакции (витамины В, С, бета-каротин, мочевая кислота, билирубин и др. ).

Третичные антиоксиданты восстанавливают молекулы, поврежденные свободными радикалами (энзимы, восстанавливающие ДНК, и метионин-сульфоксидредуктаза).



Строгая регламентация реакций ПОЛ достигается за счет функционирования согласованной системы ферментативных и неферментативных механизмов контроля за содержанием активных форм кислорода, свободными радикалами и молекулярными продуктами ПОЛ.

Контрольные вопросы:

1. Что представляет собой перекисное окисление липидов?
2. Какие группы антиоксидантов входят в антиоксидантную систему?
3. Какие группы антиоксидантов входят в антиоксидантную систему?

## **9.1. Методы определения продуктов перекисного окисления липидов**

### **Диеновые конъюгаты и кетодиены полиненасыщенных жирных кислот в крови**

Первая реакция при цепном окислении - зарождение цепи в результате образования свободного радикала окисляющего липида. Этот радикал образуется в результате одноэлектронного окисления, т.е. при отрыве атома водорода или электрона от реагирующей молекулы. Этот процесс является лимитирующим звеном всей цепной реакции и от его скорости зависит скорость процесса в целом. Наиболее легко отрывается атом водорода от углерода, находящегося в альфа положении по отношению к двойной связи в молекуле ненасыщенной жирной кислоты. Это аналогично появлению свободного электрона в системе сопряженных двойных связей. При делокализации неспаренного электрона в молекулах жирнокислотных остатков появляется система сопряженных двойных связей или конъюгированных диенов, которые легко взаимодействуют с кислородом с образованием перекисных радикалов, а в дальнейшем и гидроперекисей. Поскольку диеновая конъюгация в молекулах полиненасыщенных жирных кислот и их гидроперекиси появляются на самых начальных стадиях, то их относят к первичным продуктам перекисного окисления липидов.

#### **1. Принцип метода.**

Процесс перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот сопровождается перегруппировкой двойных связей и возникновением системы сопряженных диеновых структур, имеющих максимум поглощения при 232-234 нм с плечом в области 260-280 нм, соответствующим сопряженным кетодиенам.

#### **2. Реактивы.**

2.1 Экстрагирующая смесь гептан - изопропиловый спирт 1:1 (по объему). 2.2 Спирт этиловый, 96%.

#### **3. Оборудование и аппаратура.**

- 3.1 Спектрофотометр.
- 3.2 Баня водяная.
- 3.3 Центрифуга рефрижераторная.
- 3.4 Баллон с газообразным азотом.

3.5 Пипетки измерительные.

3.6 Пробирки химические и центрифужные.

4. Материал для исследования.

Материалом для исследования служит гепаринизированная кровь.

5. Ход определения.

5.1 В центрифужные пробирки вносят по 1 мл крови.

5.2 К пробам приливают по 7 мл экстрагирующей смеси, закрывают корковыми пробками (нельзя закрывать резиновыми пробками) и интенсивно встряхивают в течение 2 минут.

5.3 Пробы центрифугируют в течение 15 минут при 3000 об/мин при 0-4°C.

5.4 2 мл верхнего гептанового слоя переносят в чистые химические пробирки и выпаривают в токе азота на водяной бане при 40-50°C.

5.5 К сухому остатку на дне пробирки приливают 3 мл этилового спирта, пробирки интенсивно встряхивают, оставляют на 10-15 минут при комнатной температуре и перед измерением еще раз встряхивают.

5.6 Измеряют относительную плотность опытных проб при 232 и 273 нм против контрольной, содержащей этиловый спирт, в кюветах с ходом луча 10мм.

5.7 В этих же пробах определяют содержание общих липидов сульфониловым методом.

Расчет результатов.

Содержание диеновых конъюгатов (ДК) и кетодиенов (КД) рассчитывают по формуле 8:

$$C_{\text{ДК (КД)}} = \frac{E_{4232} (E_{4273})}{A}, \quad (8)$$

где  $C_{\text{ДК (КД)}}$  - содержание диеновых конъюгатов (кетодиенов) в единицах оптической плотности на мг липидов;

$E_{4232}$  - оптическая плотность пробы для диеновых конъюгатов;

$E_{4273}$  - оптическая плотность пробы для кетодиенов;

A- содержание общих липидов в пробе.

Примечание.

Пробы гепаринизированной крови исследуют не позднее 6 часов после взятия при условии хранения не выше 10°C.

Малоновый диальдегид

Перекиси липидов являются сравнительно неустойчивыми веществами и легко подвергаются гемолитическому распаду, особенно в присутствии катализаторов-ионов металлов переменной валентности, с образованием более устойчивых вторичных продуктов ПОЛ. К ним относятся такие кислородосодержащие соединения, как спирты, альдегиды и диальдегиды, лактоны, эпоксиды и т.д. В биологических системах эти продукты находятся обычно в достаточно высоких стационарных концентрациях и принимают

участие в различных биохимических процессах. Поэтому их общее содержание не отражает реальную интенсивность течения процессов ПОЛ

Активность свободно-радикального окисления липидов оценивают по накоплению липидных перекисей (вторичных продуктов), которые обычно определяют в форме малонового диальдегида. Повышение его концентрации свидетельствует об активизации процессов ПОЛ или о снижении антиоксидантной защиты организма.

#### Принцип метода.

При высокой температуре в кислой среде малоновый диальдегид (МДА) реагирует с 2-тиобарбитуровой кислотой с образованием окрашенного триметинового комплекса, имеющего максимум поглощения при 532 нм.

#### Реактивы.

10% -ный водный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ). 0.8% -ный водный раствор 2-тиобарбитуровой кислоты (2-ТБК). Готовится при нагревании в кипящей водяной бане в день исследования.

Вода дистиллированная.

#### Оборудование и аппаратура.

1. Спектрофотометр.
2. Центрифуга лабораторная.
3. Водяная баня.
4. Весы аналитические.
5. Пробирки химические и центрифужные.
6. Колбы мерные.
7. Пипетки измерительные.

#### Материал для исследования.

Материалом для исследования служит гепаринизированная кровь.

#### Ход определения.

К 2,5 мл гепаринизированной крови, помещенной в центрифужную пробирку, приливают 2,5 мл 10% - ного раствора трихлоруксусной кислоты, хорошо перемешивают стеклянной палочкой.

Пробы центрифугируют в течение 15 минут при 3000 об/мин. 3,0 мл надосадочной жидкости переносят в чистые центрифужные пробирки и прибавляют 1,5 мл 0,8% -ного раствора 2-тиобарбитуровой кислоты и хорошо перемешивают.

Пробы помещают в кипящую водяную баню на 15 минут. В ходе реакции развивается розовое окрашивание.

Пробы вынимают из кипящей водяной бани и охлаждают под струей холодной водопроводной воды. После охлаждения их центрифугируют в течение 5 минут при 3000 об /мин.

Одновременно с опытными ставят контрольную пробу, содержащую 2,5 мл дистиллированной воды, 2,5 мл 10%-ной трихлоруксусной кислоты, 1,5 мл 0,8% -ного раствора 2-тиобарбитуровой кислоты и обрабатывают аналогично опытной пробе.

Полученный центрифугат осторожно, не встряхивая, переносят в химические пробирки и измеряют оптическую плотность опытных проб при 532 нм против контрольной пробы в 10 мм-вых кюветах

Расчет содержания малонового диальдегида ведут по формуле 9:

$$C = \frac{E \times 10^6 \times 3}{1,56 \times 10^5}, \quad (9)$$

где С- концентрация малонового диальдегида, мкмоль/л,

Е- оптическая плотность пробы;

3-фактор разведения;

$10^6$ - коэффициент пересчета в мкмоль/л;

$1,56 \times 10^5$ - коэффициент молярной экстинкции триметинового комплекса МДА с 2-ТБК.

#### Примечание.

Время нагревания при  $T = 100^\circ\text{C}$  по п.5.4. не должно превышать 15 минут, т.к. при более длительном нагревании с 2-тиобарбитуровой кислотой реагируют другие химические соединения, содержащиеся в крови и дающие; с 2-ТБК окрашенные компоненты, имеющие максимум поглощения в той области спектра, что и триметиновый комплекс малонового диальдегида с 2-ТБК.

#### Флуоресцирующие основания Шиффа

Диальдегиды и ряд других вторичных продуктов ПОЛ, взаимодействуя с N-концевыми остатками аминокислот, белков и аминок группами фосфолипидов, образуют конъюгированные флуоресцирующие соединения типа оснований Шиффа. Эти соединения являются более стабильными или "конечными" продуктами ПОЛ, так как утилизация их в организме происходит с очень низкой скоростью и в результате этого они накапливаются в тканях животных. Флуоресцирующие продукты ПОЛ являются комплексами липопротеидов, входящих в состав известного внутриклеточного образования – липофусцина. Соединения типа оснований Шиффа обладают высокой реакционной способностью. Они могут производить межмолекулярные "сшивки", а также вступать в реакции полимеризации и поликонденсации. В результате этого теряются присущие биополимерам, биомембранам и другим молекулам функциональные свойства.

Принцип метода. Метод основан на измерении флуоресценции соединений типа Шиффовых оснований, извлекаемых липидными растворителями из биологического материала.

#### Реактивы.

1. Хлороформ.
2. Спирт метиловый.
3. Экстагирующая смесь хлороформ-метанол 2:1 (по объему).
4. Серная кислота, 0,1 Н.

5. Стандартный раствор хинин-сульфата (10 мг хинин-сульфата растворяют в 10 мл 0,1 Н раствора серной кислоты). Раствор может храниться в холодильнике в посуде из темного стекла в течение месяца.

Оборудование и аппаратура.

1. Спектрофлуорометр любой модели.
2. Весы аналитические.
3. Холодильник бытовой.
4. Центрифуга лабораторная.
5. Баня водяная.
6. Пипетки измерительные.
7. Колбы мерные. Пробирки химические и центрифужные.

Материал для исследования.

Материалом для исследования служит сыворотка крови.

Ход определения.

В центрифужную пробирку вносят 1 мл сыворотки крови и приливают по 4 мл смеси хлороформ-метанол. Пробу тщательно перемешивают стеклянной палочкой.

Пробирки плотно закрывают корковыми пробками, помещают в водяную баню на 5 минут, при температуре 30°C. Вынимают из бани и интенсивно встряхивают в течение 1 минуты.

Пробы центрифугируют в течение 15 минут при 3000 об/мин.

Верхний водно-спиртовой слой осторожно отсасывают. Осадок белка протыкают стеклянной палочкой. Нижний хлороформный экстракт фильтруют в чистые пробирки через смоченный хлороформом бумажный фильтр.

Измеряют флуоресценцию хлороформных экстрактов при длине волны возбуждения равной 365-370 нм и длине волны испускания 435-440 нм. Флуоресценцию стандартного раствора измеряют после его разведения в 1000 раз до концентрации 1 мкг/л. Также измеряют флуоресценцию чистого хлороформа.

Расчет результатов.

Содержание флуоресцирующих оснований Шиффа рассчитывают по формуле (10):

$$A = \frac{E_0 - E_{\text{хл}}}{E_{\text{ст}} - E_{\text{хл}}}, \quad (10)$$

где A - содержание оснований Шиффа, отн.ед./мл сыворотки;

$E_0$  - флуоресценция опытной пробы;

$E_{\text{ст}}$  - флуоресценция стандартного раствора хинин-сульфата, принятая за 1 единицу;  $E_{\text{хл}}$  - флуоресценция чистого хлороформа.

Примечание.

Сыворотку можно хранить в холодильнике не более 1 суток.

Хлороформ перед использованием очищают перегонкой.

Контрольные вопросы:

1. По каким признаком оценивают активность свободно радикального окисления?

## **9.2. Методы определения ферментативных показателей системы антиоксидантной защиты организма**

Регуляция перекисления липидов на стадии инициации осуществляется ферментами: супероксиддисмутазой и церулоплазмином (ферроксидазой); на стадии разветвления цепей: каталазой, пероксидазой и глутатионпероксидазами и глутатионтрансферазами. При этом восстановление окисленного глутатиона, образующегося в процессе взаимодействия глутатионзависимых антиперекисных систем, осуществляется глутатионредуктазой.

**Супероксиддисмутаза в эритроцитах (СОД)** занимает центральное место в системе ферментной антиоксидантной защиты организма. Она катализирует реакцию дисмутации супероксиданионрадикала с образованием перекиси водорода и молекулярного кислорода. Наличие СОД в организме позволяет поддерживать физиологическую концентрацию супероксидных радикалов в тканях, что обеспечивает возможность существования организма в кислородной атмосфере и использование им кислорода в качестве конечного акцептора электронов.

### **Принцип метода.**

Метод основан на торможении супероксиддисмутазой восстановления бесцветных тетразолиевых солей супероксидными анионрадикалами, при котором происходит их превращение в окрашенные соединения (формазапы).

### **Реактивы.**

1. 0,2 мМ раствор ЭДТА-Na (37 мг ЭДТА-Na (трилона Б) растворяют в 500 мл дистиллированной воды).

2. 0,05 М раствор тетраметиленамина (0,28 мл ТЭМЭД растворяют в 40 мл 0,2 мМ раствора ЭДТА-Na). Реактив годен для использования через 2 часа после приготовления в течение суток.

3. 0,034 мМ раствор рибофлавина (1,3 мг рибофлавина растворяют при перемешивании на магнитной мешалке в течение 20-30 минут в 100 мл дистиллированной воды). Раствор хранится в склянке из темного стекла и годен в течение рабочего дня.

4. 0,85 мМ раствор пара-нитротетразолия хлористого (п-НТХ) (32 мг п-НТХ растворяют в 100 мл дистиллированной воды). Реактив растворяется медленно, поэтому можно использовать магнитную мешалку и подогрев до 50 °С. Хранится в склянке из темного стекла в течение 1 месяца.

5. 0,1 М фосфатный буфер, рН 7,8 (1,3616 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  растворяют в 100 мл воды, 16,036 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  растворяют в 900 мл воды). К одной части раствора фосфата калия добавляют 9 частей раствора фосфата натрия и проверяют рН на рН-метре.

6. 0,1 М фосфатный буфер, рН 9,85 (половину приготовленного буфера рН 7,8 по п. 5 оставляют, а другую половину доводят под контролем рН-метра до 9,85 концентрированным раствором КОН).

7. 1% раствор йодистого калия.

8. 0,9% раствор хлористого натрия.

9. Смесь хлороформ-этанол в соотношении 5:3 (по объему).

#### Оборудование и аппаратура.

1. Фотоэлектроколориметр.

2. Лампа дневного света мощностью 40 ватт, длина трубки 1 м и более

3. Штатив для пробирок на 20-30 гнезд в один ряд, закрытый спереди и сзади черной бумагой.

4. Весы аналитические.

5. Магнитная мешалка.

6. Секундомер.

7. Центрифуга рефрижераторная.

8. Холодильник бытовой.

9. Водяная баня.

10. Колбы мерные.

11. Пипетки измерительные.

12. Пробирки химические и центрифужные.

#### Материал для исследования.

Материалом для исследования служат эритроциты, отмытые трижды от плазмы холодным 0,9% -ным раствором хлористого натрия.

#### Ход исследования.

1. К эритроцитарной массе, полученной после отмытки от плазмы 0,5 мл гепаринизированной крови приливают 5 мл охлажденной до 1 - 4°C дистиллированной воды и оставляют в ледяной бане на 15 минут для более полного гемолиза.

2. 1,5 мл гемолизата переносят в центрифужные пробирки, прибавляют 0,5 мл смеси хлороформ-этанол, перемешивают и оставляют на 10-15 минут ледяной водяной бане.

3. Пробы центрифугируют при 0 - 4 °С в течение 15 минут при 3000 об/мин.

4. Надосадочную жидкость (бесцветную или слегка желтоватую) разбавляют дистиллированной водой в 20 раз. Половину полученного биологического материала оставляют в химических пробирках в ледяной водяной бане.

5. Другую половину биологического материала помещают в кипящую водяную баню на 10 минут (вода должна постоянно кипеть) для инактивации фермента.

6. Для каждой пробы берут три химические пробирки, ставят их в закрытый штатив и добавляют в них растворы реактивов и биологический материал в следующем порядке и количествах, Таблица 2:

Таблица 2 – Растворы реактивов для добавления в биологический материал

№. п /п	Реактивы	Опыт	Контроль	Контроль на реактивы
1.	0,1 М фосфатный буфер, рН 7,8	1,0 мл	1,0 мл	-
2.	0,1 М фосфатный буфер, рН 9,85	-	-	2,0 мл
3.	0,05 М раствор ТЭМЭДа	1,0 мл	1,0 мл	-
4.	0,85 М раствор п-нитротетразолия	1,0 мл	1,0 мл	1,0 мл
5.	Вода дистиллированная	5,0 мл	5,0 мл	5,0 мл
6.	Биологический материал по п. 5.4	0,2 мл	-	-
7.	Биологический материал по п. 5.5	-	0,2 мл	0,2 мл
8.	0,034 мМ раствор рибофлавина	2,0 мл	2,0 мл	2,0 мл

7. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и штатив с ними устанавливают на расстоянии 20 см от лампы дневного света.

8. Включают лампу, прогревают ее в течение 10 минут. Открывают переднюю стенку штатива и облучают пробы в течение 5 минут (по секундомеру) и закрывают переднюю стенку штатива.

9. Во все пробирки добавляют (как можно быстрее) по 1 мл 1% -ного раствора йодистого калия (для остановки реакции) и сразу интенсивно перемешивают.

10. Измеряют оптическую плотность каждой пробы на фотоэлектроколориметре при зеленом светофильтре № 5 в кюветах с ходом луча 20 мм против дистиллированной воды.

11. Количество гемоглобина в гемолизатах по п. 5.1 определяют гемоглобинцианидным методом.

#### Расчет результатов.

1. Находят процент торможения супероксиддисмутазой образования формазана п-НТХ по формуле (11):

$$T = \frac{E_k - E_{оп}}{E_k - E_{кр}} * 100, \quad (11)$$

T- процент торможения реакции;

$E_k$  - оптическая плотность контрольной пробы;

$E_{оп}$  - оптическая плотность опытной пробы;  $E$  - оптическая плотность пробы контроля на реактивы. Принято считать, что 50%-ное ингибирование реакции соответствует одной относительной единице активности фермента.



3. Количество относительных единиц активности фермента, внесенного в пробу, рассчитывают по формуле (12):

$$M = 10^{(0,026 * T - 1,3)}, \quad (12)$$

где M- количество относительных единиц активности пробы;

T - процент торможения реакции.

3. Активность супероксиддисмутазы в пересчете на содержание гемоглобина рассчитывается по формуле (13):

$$A = \frac{M * E_{ст}}{0,1236 * E_{гем}} * 100, \quad (13)$$

где A- активность супероксиддисмутазы, ед. акт/мг гемоглобина;

M - количество единиц фермента в пробе;

$E_{ст}$  - оптическая плотность стандартного раствора, содержащего 59,75 мг гемоглобинцианида в 100 мл по п. 5.11;

$E_{гем}$  - оптическая плотность опытной пробы гемолизата при определении гемоглобина по п. 5.11.

#### 7. Примечания.

7.1. Пробы гепаринизированной крови можно хранить при +4°C не более 1 суток.

7.2. В добавке биологического материала должна содержаться примерно 1 единица активности фермента (процент торможения должен составлять 35-55%)

7.3. При определении активности фермента в эритроцитах птиц отмытую эритроцитарную массу из 0,5 мл крови лизируют 2,5 мл холодной дистиллированной воды. Центрифугируют 15 минут при 3000 об/мин для осаждения ядер эритроцитов. Берут 1,5 мл надосадочной жидкости и далее продолжают согласно п. 5.2.

#### Церулоплазмин в сыворотке крови

Подобно супероксиддисмутазе реакцию дисмутации катализирует другой медьсодержащий белок - церулоплазмин (ферроксидаза). В отличие от СОД, защищающей внутриклеточные структуры, церулоплазмин функционирует в крови и перехватывает свободно-радикальные формы кислорода, предохраняя таким образом от их повреждающего действия липидосодержащие биоструктуры. Связывание супероксиданион-радикалов церулоплазмином происходит с участием пары ионов меди. При этом происходит четырехэлектронное восстановление кислорода до воды, а не перекиси водорода, как это происходит при действии СОД. Однако эффективность церулоплазмينا в отношении связывания супероксиданиона примерно в 100 раз ниже, чем у СОД. Несмотря на это, в настоящее время церулоплазмин рассматривается в качестве основного антиоксиданта плазмы крови. Особенностью этого белка является высокая стабильность к токсическому действию активных форм кислорода, что позволяет ему

сохранять биологическую активность в условиях интенсивной генерации активных форм кислорода. При недостаточности церулоплазмينا ионы меди выходят во внесосудистое пространство (содержание меди в крови также снижается). Они проходят через базальные мембраны почек в гломерулярный фильтрат и выводятся с мочой или накапливаются в соединительной ткани. Низкие уровни церулоплазмينا в сыворотке крови отмечаются также при нефротическом синдроме, заболеваниях желудочно-кишечного тракта, тяжелых заболеваниях печени вследствие его потерь и нарушения синтеза.

#### 1. Принцип метода.

Метод основан на регистрации оптической плотности при 530 нм окрашенных продуктов, образующихся при ферментативном окисления церулоплазмином солянокислого парафенилендиамина.

#### 2. Реактивы.

2.1. 0,4 М ацетатный буфер, рН 5,5 (54,4 г  $\text{CH}_3\text{COONa}$  х  $3\text{H}_2\text{O}$  растворяют в 900 мл дистиллированной воды, доводят рН до 5,5 под контролем рН-метра концентрированной уксусной кислотой и объем доводят водой до 1 л). Хранится в холодильнике в течение нескольких месяцев.

2.2. Раствор роданистого калия, 1,5%.-ный.

2.3. Буферно-субстратная смесь (10 мг парафенилендиамина гидрохлорида растворяют в 20 мл ацетатного буфера рН 5,5). Готовят в день проведения анализов.

2.4. 10 мМ раствор бензохинона (10,8 мг бензохинона, высушенного до постоянной массы в эксикаторе, растворяют в 10 мл дистиллированной воды).

#### 3. Оборудование и аппаратура.

3.1. Спектрофотометр или фотоэлектроколориметр.

3.2. Баня водяная.

3.3. Секундомер.

3.4. Весы аналитические.

3.5. Пипетки измерительные.

3.6. Пробирки химические.

#### 4. Материал для исследования.

Материалом для исследования служит сыворотка крови.

#### 5. Ход определения.

5.1. В две химические пробирки вносят по 0,1 мл сыворотки крови, приливают по 1 мл буферно-субстратной смеси и инкубируют в водяной бане при  $37^\circ\text{C}$  в течение 5 минут.

5.2. Не вынимая пробирок из водяной бани, в одну из них (контрольную) приливают 2 мл охлажденного до  $0-4^\circ\text{C}$  раствора роданида калия. Ровно через 10 минут (по секундомеру) приливают 2 мл охлажденного раствора роданида калия во вторую (опытную) пробирку и обе пробирки вынимают из водяной бани.

5.3. Измеряют оптическую плотность опытной пробы (Е) против контрольной в кюветах с ходом луча 10 мм на спектрофотометре при 530 нм или на фотоэлектроколориметре с зеленым светофильтром.

#### 6. Построение калибровочного графика.

Из свежеприготовленного раствора бензохинона с концентрацией 10 мМ/л готовят разведения стандартных растворов в интервале концентраций от 0,5 до 5,0 мМ/л. Затем к 0,1 мл каждого стандартного раствора добавляют по 1 мл буферно-субстратной смеси и оставляют при комнатной температуре на 10 минут. После этого в пробы добавляют по 2 мл раствора роданистого калия и измеряют оптическую плотность при 530 нм на спектрофотометре или зеленом светофильтре на фотоэлектроколориметре в кюветах с ходом луча 10 мм. В качестве раствора для сравнения используют смесь 0,1 мл воды, 1 мл ацетатного буфера и 2 мл раствора роданистого калия. На миллиметровой бумаге строят калибровочную кривую, откладывая по оси абсцисс значения концентраций стандартных растворов, а по оси ординат соответствующие им значения оптической плотности.

#### 7. Расчет результатов.

Ферроксидазную активность церулоплазмينا рассчитывают по формуле (14):

$$C = \frac{X}{t} \quad (14)$$

где С - активность церулоплазмينا, мкМ бензохинона/л мин;

X - количество бензохинона, найденное по калибровочной кривой, мМ/л;

t - разница времени инкубации контрольной и опытной проб, мин.

(для описанных выше условий 1-10 мин).

#### 8 Примечания.

8.1. Сыворотка должна быть без следов гемолиза.

8.2. Сыворотка может храниться при 0 - 4 ° С в течение недели.

Образующая в результате реакции дисмутации супероксидных радикалов, катализируемой супероксиддисмутазой, а также другими путями, перекись водорода является высокоактивным токсическим агентом. Если бы в клетке не было бы механизмов быстрого обезвреживания перекиси водорода, то она, реагируя с супероксиданионом, генерировала бы радикал гидроксила, который чрезвычайно активно окисляет органические молекулы практически всех типов, полностью снимая антиоксидантный эффект СОД и церулоплазмينا. Поэтому поддержание нормального уровня обмена перекиси водорода и предотвращений ее накопления в клетках и тканях имеет жизненно важное значение. Первоочередную роль в этом играют ферменты, которые избирательно катализируют разрушение ее молекул - каталаза и различные пероксидазы.

**Каталаза в крови** - гематинсодержащий фермент, встречаемый во всех тканях, где происходят процессы клеточного дыхания с участием цитохромов, т.е. где возможно образование пероксида водорода, весьма токсичного для клеток соединения, которое должно быть удалено. Каталаза

содержит четыре гемовых группы на одну молекулу фермента. Она является наиболее активным из известных ферментов. Одна молекула каталазы способна разложить 44000 молекул перекиси водорода в секунду. Каталаза широко распространена в организме животных и птиц, причем наибольшая активность фермента обнаружена в печени, эритроцитах и почках. Активность ее возрастает всегда, когда активизируются процессы ПОЛ в организме и возрастает концентрация перекиси водорода в клетках.

#### Принцип метода.

Метод основан на способности перекиси водорода образовывать с молибдатом аммония стойкий окрашенный комплекс с максимумом поглощения при 410 нм.

#### Реактивы.

2.1. 0,04412 Н раствор перекиси водорода (готовят примерно 0,08% -ный раствор перекиси водорода и устанавливают точную концентрацию титрованием 0,01 Н раствором  $\text{KMnO}_4$ ). На титрование 5 мл 0,04412 Н раствора перекиси водорода должно идти 22,06 мл 0,01 Н раствора перманганата калия. По результатам титрования раствор перекиси водорода доводят до нужной концентрации дистиллированной водой).

2.2. 4,5%-ный раствор аммония молибденовокислого (4,5 г молибдата аммония растворяют в 9565 мл дистиллированной воды).

2.3. 0,1 М трис-НСl буфер, рН 7,4.

2.4. Буферно-субстратная смесь (10 мл трис-НСl буфера рН 7,4 смешивают с 30 мл 0,04412 Н раствора перекиси водорода).

#### 3. Оборудование и аппаратура.

3.1. Спектрофотометр.

3.2. Секундомер.

3.3. Баня водяная.

3.4. Весы аналитические.

3.5. Бюретка.

3.6. Пипетки измерительные.

3.7. Пробирки химические.

#### 4. Материал для исследования.

Материалом для исследования служит гепаринизированная кровь.

#### 5. Ход определения

5.1. К 0,5 мл гепаринизированной крови приливают 3,5 мл дистиллированной воды, хорошо перемешивают и оставляют на 5-10 минут при комнатной температуре (основной гемолизат). К 0,2 мл основного гемолизата прибавляют 3,8 мл воды и тщательно перемешивают (рабочий гемолизат).

5.2. В две химические пробирки наливают по 2,0 мл буферно-субстратной смеси и преинкубируют в водяной бане при 37, 5 °С в течение 10 минут.

5.3. В одну из пробирок (опытную) добавляют 0,1 мл рабочего гемолизата, тщательно перемешивают и инкубируют в водяной бане при 37°С в течение 3 минут (по секундомеру).

5.4. Реакцию останавливают добавлением в опытную пробу 2,0 мл молибдата аммония. Одновременно приливают в контрольную пробирку сначала 2,0 мл молибдата аммония, а затем 0,1 рабочего гемолизата.

5.5. Измеряют оптическую плотность опытной и контрольной проб при 410 нм в кювете с ходом луча 10 мм. В качестве раствора сравнения используют смесь, состоящую из 1 мл буфера, 3 мл дистиллированной воды и 0,1 мл рабочего гемолизата.

#### 6. Расчет результатов.

Активность каталазы рассчитывают по формуле (15):

$$C = \frac{(E_k - E_{оп}) * 4,1 * 16 * 10^5}{22,2 * 3} \quad (15)$$

где C - активность фермента, М.Е. (мкМ перекиси водорода/л.мин)

$E_k$  - оптическая плотность контрольной пробы;

$E_{оп}$  - оптическая плотность опытной пробы,

4,1- конечный объем пробы,

$16 \times 10^5$  - фактор разведения,

3- время инкубации, мин.

#### 7. Примечания.

7.1. Пробы гепаринизированной крови можно хранить при +4°C в течение суток.

**Пероксидаза в крови** - в отличие от каталазы содержит всего одну гемовую группу на одну молекулу фермента. Также как и каталаза, пероксидаза восстанавливает  $H_2O_2$  до воды, используя в качестве доноров водорода фенолы, амины, органические кислоты. На этом основано большинство методов определения активности пероксидазы, например, по изменению окраски при окислении бензидина перекисью водорода. В животных тканях пероксидаза распространена не так широко, как каталаза. Наибольшая активность пероксидаз выявлена в тонком и толстом кишечнике, селезенке и легких. Пероксидазная активность крови обусловлена, в основном, ее наличием в гранулоцитах.

#### Принцип метода.

Метод основан на определении скорости реакции окисления бензидина перекисью водорода при участии фермента с образованием окрашенного продукта реакции, имеющего максимум поглощения при 520 нм.

#### 2. Реактивы.

2.1. 2,5 мМ раствор бензидина (184,2 мг бензидина растворяют при нагревании смеси 100 мл дистиллированной воды и 2,3 мл ледяной уксусной кислоты. После полного растворения бензидина раствор охлаждают и растворяют в нем 5,45 г трехводного уксуснокислого натрия. После этого общий объем раствора доводят дистиллированной водой до 400 мл).

2.2. 0,333 Н перекись водорода (готовят 0,6%-ный раствор перекиси водорода и концентрацию перекиси определяют титрованием 0,1 Н раствором перманганата калия. На титрование 3,0 мл 0,333 Н перекиси

водорода должно идти 10,0 мл 0,1 НКМnO<sub>4</sub>. По результатам титрования раствор перекиси водорода доводят до нужной концентрации дистиллированной водой).

### 3. Оборудование и аппаратура.

- 3.1. Спектрофотометр с термостатируемой кюветой.
- 3.2. Секундомер.
- 3.3. Ультратермостат.
- 3.4. Весы аналитические.
- 3.5. Бюретка для титрования.
- 3.6. Пробирки химические.

### 4. Материал для исследования.

Материалом для исследования служит гепаринизированная кровь.

### 5. Ход определения.

5.1. К 0,1 мл основного гемолизата по п. 5.1 " Метода определения активности каталазы" прибавляют 19,9 мл дистиллированной воды (рабочий гемолизат).

5.2. В термостатируемую кювету с ходом луча 10 мм приливают 2,0 мл раствора бензидина и 0,5 мл раствора перекиси водорода, предварительно подогретых до 37°C.

5.3. Перемешивают содержимое кюветы, открывают шторку камеры фотоэлементов спектрофотометра и, изменяя ширину щели, устанавливают показания спектрофотометра на нулевую отметку шкалы оптической плотности при длине волны 520 нм.

5.4. В кювету добавляют 0,1 мл рабочего гемолизата, перемешивают и ровно через 1 минуту (по секундомеру) снимают показания оптической плотности опытной пробы.

5.5. Для учета изменения оптической плотности за счет неферментативного окисления бензидина аналогично опытной пробе проводят измерение оптической плотности контрольной пробы, содержащей вместо рабочего гемолизата 0,1 мл дистиллированной воды.

### 6. Расчет результатов.

Активность пероксидазы крови рассчитывается по формуле (16):

$$C = \frac{(E_0 - E_k) \times 16,08 \cdot 10^6}{60}, \quad (16)$$

где C - активность фермента, ед.опт.пл./л.сек;

E<sub>0</sub> - оптическая плотность опытной пробы;

E<sub>k</sub> - оптическая плотность контрольной пробы;

16,08x10<sup>6</sup> - фактор разведения;

60 - время проведения реакции, сек.

### 7. Примечания.

7.1. Поскольку метод требует определения оптической плотности реакционной смеси в строго определенный момент времени, целесообразно использовать спектрофотометр с цифровой регистрацией результатов измерений.

7.2. Пробы гепаринизированной крови можно хранить при +4° С в течение 1 суток.

**Глутатионпероксидаза в крови** - селеносодержащий фермент катализирующий превращение перекиси водорода и органических гидроперекисей до гидросоединений, которые в дальнейшем могут метаболизироваться клеточными системами. На одну молекулу глутатионпероксидазы приходится четыре атома селена - по одному атому, расположенному в активном центре каждой субъединицы. Она предотвращает продолжение процесса ПОЛ, обезвреживая уже образовавшиеся гидропероксиды жирных кислот, и одновременно предупреждает их образование. Под ее влиянием восстановленный глутатион реагирует с пероксидом водорода и превращается в окисленный, который при участии фермента глутатионпероксидазы вновь переходит в восстановленный. Поддержание достаточного уровня восстановленного глутатиона для поддержания функционирования глутатионзависимых антиперекисных систем осуществляется специальным ферментом - глутатионредуктазой.

#### 1. Принцип метода.

Глутатионпероксидаза, восстанавливая гидроперекиси, окисляет восстановленный глутатион, по уменьшению, которого в среде инкубации определяется активность фермента.

#### 2. Реактивы.

2.1. 0,1 М фосфатный буфер, рН 7,4 (6,8 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  растворяют в 500 мл воды, 11,4 г  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$  растворяют в 500 мл воды. Полученные растворы смешивают под контролем рН-метра до получения необходимого значения рН).

2.2. 31,88 мМ раствор восстановленного глутатиона (24,29 мг восстановленного глутатиона, 14,52 мг азидата натрия и 27,68 мг ЭДТА-Na растворяют в 35 мл фосфатного буфера рН 7,4). Раствор готовится непосредственно перед проведением исследования).

2.3. 13,8 мМ раствор перекиси водорода (на титрацию 10 мл 13,8 мМ раствора перекиси водорода должно идти 6,96 мл 0,01 Н раствора  $\text{KMnO}_4$ . По результатам титрования раствор перекиси водорода доводится водой до необходимой концентрации).

2.4. 10% раствор трихлоруксусной кислоты (10 г. ТХУ растворяют в 90 мл дистиллированной воды).

2.5. 0,3 М фосфатный буфер, рН 8,0 (10,2 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  растворяют в 250 мл воды, 34,2 г  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$  растворяют в 500 мл воды. Под контролем рН-метра растворы смешивают до получения необходимого значения рН).

2.6. 10,0 мМ раствор реактива Элмана (39,6 мг 5,5 дитио-бис-(2-нитробензойной) кислоты растворяют в 10 мл абсолютного метилового спирта).

#### 3. Оборудование и аппаратура.

3.1. Спектрофотометр.

3.2. Центрифуга рефрижераторная.

3.3. Баня водяная.

- 3.4. Секундомер
- 3.5. Холодильник бытовой
- 3.6. Весы аналитические.
- 3.7. рН-метр
- 3.8. Пипетки измерительные.
- 3.9. Пробирки химические и центрифужные.
- 3.10. Колбы мерные

4. Материал для исследования.

Материалом для исследования служит гепаринизированная кровь.

5. Ход определения.

5.1. В химическую пробирку наливают 0,5 мл крови и добавляют 3,5 мл дистиллированной воды, тщательно перемешивают и оставляют в холодильнике на 10-15 минут для более полного гемолиза.

5.2. В химическую пробирку приливают 1 мл раствора глутатиона и прибавляют 1 мл гемолизата.

5.3. Переносят по 0,5 мл смеси в две центрифужные пробирки, помещают их в водяную баню при 37° С и инкубируют в течение 5 минут.

5.4. В опытную пробирку добавляют 0,1 мл раствора перекиси водорода, интенсивно встряхивают и оставляют в водяной бане.

5.5. Ровно через 1 минуту с момента добавления раствора перекиси водорода (по секундомеру) в опытную и контрольную пробирки приливают по 2 мл холодной 10% -ной ТХУ. В контрольную пробирку только после этого добавляют 0,1 мл раствора перекиси водорода.

5.6. Обе пробирки встряхивают и помещают на 10 минут в холодильник

5.7. Пробы центрифугируют в течение 15 минут при 3000 об/мин и 0-4°С.

5.8. По 0,5 мл надосадочной жидкости из контрольной и опытной пробирок переносят в химические пробирки и приливают по 10 мл фосфатного буфера, рН 8,0.

5.9. В обе пробирки прибавляют по 0,05 мл реактива Элмана и содержимое тщательно перемешивают.

5.10. Измеряют оптическую плотность контрольной пробы по сравнению с опытной в кювете с ходом луча 10 мм при 412 нм.

5.11. Для определения скорости неферментативного окисления восстановленного глутатиона проводят исследование проб по п. п. 5.2. -5.10., в которые вместо гемолизата прибавляют 1 мл воды.

6. Расчет активности глутатионпероксидазы крови проводят по формуле (17):

$$C = \frac{(E_0 - E_k) \times 10,55 \times 10^6 \times 166,4}{13100}, \quad (17)$$

где С – активность фермента, М.Е. (мкМ восстановленного глутатиона /л мин)

E<sub>0</sub>- оптическая плотность контрольной пробы по сравнению с опытной при ферментативном окислении глутатиона;



Ек- оптическая плотность контрольной пробы по сравнению с опытной при Iи ферментативном окислении глутатиона по п. 5.11

10,55- конечный объем пробы;

166,4 - фактор разведения;

$10^6$  - пересчет в мкМ;

13100 - коэффициент малярной экстинкции ТНФА, образующегося после окисления 2- нитробензойной кислоты, входящей в состав раствора Элмана.

**Глутатионредуктаза** - имеет молекулярную массу около 44000 и локализована, в основном, там же, где и антиперекисные глутатионзависимые ферменты. Активность глутатионредуктазы существенным образом зависит от обеспеченности организма рибофлавином. Наибольшая активность фермента обнаружена в почках, тонком кишечнике, эритроцитах.

#### 1. Принцип метода.

Глутатионредуктаза, используя восстановленные формы пиридиннуклеотидов, переводит окисленную форму глутатиона в восстановленную. По степени увеличения количества восстановленного глутатиона в среде инкубации рассчитывается активность фермента.

#### 2. Реактивы.

2.1. 0,1 М фосфатный буфер, рН 7,4 (6,8 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  растворяют в 500 мл воды, 11,4 г  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  х  $3\text{H}_2\text{O}$  растворяют в 500 мл воды. Полученные растворы смешивают под контролем рН-метра до получения необходимого значения рН).

2.2. 4,0 мМ раствор окисленного глутатиона (134,75 мг окисленного глутатиона и 0,5 мг ЭДТА-На растворяют в 55 мл фосфатного буфера рН 7,4). Раствор готовят в день проведения исследования.

2.3. 5,35 мМ раствор НАДФ-Н (11,16 мг НАДФ-Н<sub>2</sub> растворяют в 2,5 мл воды. Раствор готовят перед использованием.

2.4. 10% -ный раствор трихлоруксусной кислоты (10 г ТХУ растворяют в 90 мл дистиллированной воды).

2.5. 0,3 М фосфатный буфер, рН 8,0 (10,2 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  растворяют в 250 мл воды, 34,2 г  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  х  $3\text{H}_2\text{O}$  растворяют в 500 мл воды. Под контролем рН-метра растворы смешивают до получения необходимого значения рН).

2.6. 10,0 мМ раствор реактива Элмана (39,6 мг 5,5 дитио-бис-(2-нитробензойной) кислоты растворяют 10 мл абсолютного метилового спирта).

#### 3. Оборудование и аппаратура.

3.1. Спектрофотометр.

3.2. Центрифуга рефрижераторная.

3.3. Баня водяная.

3.4. Секундомер

3.5. Холодильник бытовой

3.6. Весы аналитические.

3.7. рН-метр

3.8. Пипетки измерительные.

3.9 Пробирки химические и центрифужные.

3.10. Колбы мерные

#### 4.Материал для исследования.

Материалом для исследования служит гепаринизированная кровь.

5. Ход определения.

5.1. В химическую пробирку наливают 0,5 мл крови и добавляют 3,5 мл дистиллированной воды, тщательно перемешивают и оставляют в холодильнике на 10-15 минут для полного гемолиза.

5.2. В химическую пробирку приливают 2,0 мл раствора окисленного глутатиона, прибавляют 1 мл гемолизата и хорошо перемешивают.

5.3. Переносят по 1,0 мл смеси в две центрифужные пробирки, помещают их в водяную баню при 37°C и инкубируют в течение 5 минут.

5.4. В опытную пробирку добавляют 0,1 мл раствора НАДФ-Н<sub>2</sub>, интенсивно встряхивают и оставляют в водяной бане.

5.5. Ровно через 10 минут (по секундомеру) в опытную и контрольную пробирки приливают по 1 мл холодной 10% -ной ТХУ. В контрольную пробирку только после этого добавляют 0,1 мл раствора НАДФ-Н<sub>2</sub>.

5.6. Обе пробирки встряхивают и помещают на 10 минут в холодильник.

5.7. Пробы центрифугируют в течение 15 минут при 3000 об /мин и 0-4°C.

5.8. По 1 мл надосадочной жидкости из контрольной и опытной пробирок переносят в соответствующие химические пробирки и приливают по 5 мл фосфатного буфера, рН- 8,0.

5.9. В обе пробирки прибавляют по 0,05 мл реактива Элмана и содержимое тщательно перемешивают. 5.10. Измеряют оптическую плотность контрольной пробы по сравнению с опытной в кювете с ходом луча 10 мм при 412 нм.

6. Расчет активности глутатионредуктазы крови проводят по формуле (18):

$$C = \frac{(E_0 - E_k) \times 6,05 \times 10^6 \times 84}{13100 \times 10 \times 2}, \quad (18)$$

где С – активность фермента, М.Е. (мкМ окисленного глутатиона /л мин)

E<sub>0</sub> - оптическая плотность опытной пробы;

E<sub>к</sub> - оптическая плотность контрольной пробы;

6,05- конечный объем пробы;

84 - фактор разведения крови;

10<sup>6</sup> - пересчет в мкМ;

2 - коэффициент пересчета на окисленный глутатион;

13100 - коэффициент малярной экстинкции ТНФА, образующегося после окисления 2- нитробензойной кислоты, входящей в состав раствора Элмана.

Контрольные вопросы:

1. Какими ферментами осуществляется регуляция перекисления липидов на стадии инициации?
2. На чем основан метод определения церулоплазмينا в сыворотке крови?
3. Каким ферментом является каталаза в крови?
4. В чем заключается принцип метода определения глутатионпероксидазы в крови?
5. От чего зависит активность глутатионредуктазы?

### **9.3. Методы определения неферментативных показателей системы антиоксидантной защиты организма**

Помимо описанной выше системы основных ферментов антиоксидантной системы организма, ограничивающих процесс перекисного окисления липидов на разных его стадиях, система антиоксидантной защиты включает в себя и неферментативное звено, состоящее из низкомолекулярных эндогенных антиоксидантов (витамины Е, С, А, и др.).

Центральное место в неферментативном звене антиоксидантной системы организма животных занимают токоферолы. Они широко представлены в растительном и животном мире, однако они не синтезируются в организме животных и птиц. В зависимости от числа и пространственного расположения метальных групп принято рассматривать восемь токоферолов (альфа, бета, гамма и т.д.), из которых альфа-токоферол является наиболее биологически активным.

**Витамин Е (альфа-токоферол) в сыворотке крови** - является основным эндогенным жирорастворимым антиоксидантом. Свою антиоксидантную функцию он может осуществлять тремя способами: создавая компактную мембранную архитектуру, предотвращающую атаку активных форм кислорода на ненасыщенные жирные кислоты мембранных фосфолипидов; локально разрушая образующиеся липидные перекисные радикалы и разрушая кислородные радикалы в полярных участках мембран, где функционируют белки электронотранспортной цепи. Антиоксидантную активность витамина Е связывают, главным образом, с взаимодействием с перекисными соединениями органической природы. Активно реагировать с перекисными радикалами может только восстановленная (фенольная) форма витамина Е, имеющая свободную гидроксильную группу. Хинонная (окисленная) форма практически не реагирует с перекисными радикалами. Переход витамина Е из одной формы в другую со значительной потерей антирадикальной активности можно рассматривать как способ регуляции интенсивности процессов перекисного окисления липидов. Вещества, способные восстанавливать хинонную форму в фенольную, регенерируют антирадикальную активность витамина Е и являются поэтому его синергистами. Как правило, роль синергистов выполняют вещества, имеющие невысокий окислительно-восстановительный потенциал и легко

переходящие из окисленной формы в восстановленную (например, аскорбиновая и лимонная кислоты). Основная функция токоферола - регуляция интенсивности свободных радикалов в клетках, ограничение процессов перекисного окисления жирных ненасыщенных кислот в липидах биологических мембран. Благодаря токоферолу обеспечивается стабильность клеточных мембран. Недостаточность токоферола сопровождается усилением процессов перекисного окисления липидов.

#### 1. Принцип метода.

Метод основан на определении ионов двухвалентного железа, образующихся при взаимодействии токоферолов с хлорным железом, в виде окрашенного комплекса  $Fe^{52+}$  с ортофенантролином (ОФ) или батофенантролином (БФ).

#### 2. Реактивы.

2.1. Спирт этиловый, 96%.-ный.

2.2. Гексан, хч.

2.3. Бензол, перегнанный.

2.4. 0,025%-ный раствор хлорного железа в эталоне (25 мг  $FeCl_3$  растворяют в 10 мл этанола, и этот раствор разводят этанолом еще в 10 раз). Раствор готовится в день проведения анализов. Годен в течение рабочего дня.

2.5. 0,05%-ный раствор орто- или батофенантролина в этаноле (25 мг ОФ или БФ растворяют в 10 мл этанола и этот раствор разводят еще в 5 раз). Раствор готовится в день проведения анализов. Годен в течение рабочего дня.

#### 3. Оборудование и аппаратура.

3.1. Спектрофотометр.

3.2. Весы аналитические.

3.3. Баня водяная.

3.4. Центрифуга.

3.5. Секундомер.

3.6. Баллон с газообразным азотом.

3.7. Пинетки измерительные.

3.8. Пробирки центрифужные и химические.

3.9. Пробирки с притертыми пробками.

#### 4. Материал для исследования.

Материалом для исследования служит сыворотка крови.

#### 5. Ход определения.

5.1. В пробирки с притертыми пробками вносят по 1 мл сыворотки крови и приливают по 1 мл этилового спирта. Тщательно перемешивают стеклянной палочкой.

5.2. К пробам добавляют 3 мл гексана и энергично встряхивают в течение 2-х минут.

Пробы после встряхивания переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют в течение 10 минут при 2500-3000об/мин.

5.4. Из верхнего гексанового слоя отбирают по 2 мл, переносят в чистые химические пробирки и в них выпаривают гексан в токе азота на водяной бане при температуре не выше 50°C.

5.5. Сухой остаток растворяют в 1 мл бензола, прибавляют по 1 мл 0,025% -ного раствора хлорного железа и выдерживают при комнатной температуре в течение 5 минут.

5.6. К пробам (по одной) приливают по 1 мл 0,05% -ного раствора ортофенантролина (или батофенантролина) и ровно через 2 минуты (по секундомеру) измеряют оптическую плотность ( $E_{оп}$ ) при длине волны 510 нм (при использовании ортофенантролина) или при 535 нм (при использовании батофенантролина) против пробы, содержащей 1 мл бензола и 2 мл этилового спирта.

5.7. Одновременно с опытными ставят контрольную пробу, содержащую 1 мл бензола, 1 мл раствора хлорного железа, 1 мл раствора орто- или батофенантролина. Оптическую плотность контрольной пробы ( $E_k$ ) измеряют также через 2 минуты (по секундомеру) после добавления ОФ или БФ.

При определении витамина Е в сыворотке крови крупного рогатого скота, содержащей много каротина, после центрифугирования верхний гексановый слой по возможности максимально переносят в чистые химические пробирки и измеряют оптическую плотность проб при 462 нм против чистого гексана ( $E_{462}$ ). Далее отбирают по 2 мл гексанового экстракта, переносят его в новые химические пробирки и далее продолжают согласно п. 5.4.

#### 6. Построение калибровочного графика.

4,31 мг альфа-токоферола (фирмы Serva, Германия) растворяют в 100 мл бензола (концентрация полученного раствора - 100 мкМ/л). Из этого раствора готовят основной раствор с концентрацией альфа-токоферола - 40 мкМ/л. Из основного раствора путем разбавления бензолом готовят рабочие стандарт-ные растворы в интервале концентраций 30-1 мкМ/л. Для построения калибровочной кривой берут по 1 мл каждого из стандартных рабочих растворов (в двух-трех повторностях), прибавляют по 1 мл 0,025 % -ного раствора хлорного железа и далее обрабатывают также как и опытные пробы согласно п. 5.6. На миллиметровой бумаге по оси абсцисс откладывают значения концентраций стандартных растворов, а по оси ординат - соответствующие им значения оптических плотностей ( $E$ ) равных разнице между оптической плотностью каждого стандартного раствора и оптической плотностью контрольной пробы.

#### 7. Расчет результатов.

Количество витамина Е, участвующего в реакции, определяют по калибровочной кривой, учитывая, что:

$$- \text{ для свиней, овец, птиц } E = E_{оп} - E_k$$

Концентрацию витамина Е в сыворотке крови рассчитывают по формуле (19):

$$C = \frac{A \cdot 3}{2} \quad (19)$$

где С - содержание витамина Е в сыворотке, мкМ/л;

А- количество витамина Е, найденное по калибровочной кривой;

3 - общее количество гексанового экстракта;

2 - объем выпаренного гексанового экстракта.

#### 8. Примечание.

8.1. Сыворотка может храниться в холодильнике при 0 - 4° С в течение двух недель.

8.2. Пробы при исследовании необходимо беречь от прямого попадания света

**Глутатион в крови** - серусодержащий трипептид, образованный аминокислотами: цистеином, глутаминовой кислотой и глицином имеет почти универсальное распространение в тканях животных, растений и микроорганизмов. Глутатион участвует в транспорте аминокислот, обмене дисульфидов и поддержании сульфгидрильных групп белков в восстановленном состоянии. Он может ингибировать ПОЛ на уровне инициирования цепного процесса, способен реагировать со свободными радикалами так же активно, как альфа-токоферол.

Помимо глутатиона, антиоксидантными свойствами обладают и другие соединения, содержащие сульфгидрильные группы. Это, в первую очередь, серусодержащие аминокислоты.

Кроме указанных выше основных низкомолекулярных эндогенных антиоксидантов, подобные свойства обнаружены у витамина А и каротиноидов, витамина К, убихинона (коэнзим Q), билирубина, мочевой кислоты, эстрогенов и других, различных по химическому составу соединений.

Таким образом, в организме существует целый ряд взаимосвязанных антиоксидантных систем, основная цель которых заключается в поддержании ферментативных и неферментативных реакций на стационарном уровне.

#### 1. Принцип метода.

Сульфгидрильная группа восстановленного глутатиона вступает в реакцию с 5,5-дитио-бис-(2-нитробензойной) кислотой (реактив Элмана), в результате чего в эквимольных количествах образуется окрашенный в желтый цвет тионитрофенильный анион (ТНФА), имеющий максимум поглощения при 412 нм.

#### 2. Реактивы.

2.1. 20% -ная трихлоруксусная кислота (ТХУ).

2.2. 0,3 М фосфатный буфер, рН 8,0 (10,2 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  растворяют в 250 мл воды, 34,2 г  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  растворяют в 500 мл воды. Под контролем рН-метра растворы смешивают до получения необходимого значения рН).

2.3. 0,01 М раствор реактива Элмана (39,6 мг 5,5 дитио-бис-(2-нитробензойной) кислоты растворяют в 10 мл абсолютного метилового спирта).

### 3. Оборудование и аппаратура.

- 3.1. Спектрофотометр.
- 3.2. Центрифуга рефрижераторная.
- 3.3. Весы аналитические.
- 3.4. Холодильник бытовой.
- 3.5. Пипетки измерительные.
- 3.6. Пробирки химические и центрифужные.

### 4. Материал для исследования.

Материалом для исследования служит гепаринизированная кровь.

### 5. Ход определения.

5.1. В химическую пробирку наливают 0,5 мл крови, 3,5 мл дистиллированной воды и хорошо перемешивают для лучшего гемолиза.

5.2. 2,0 мл разведенной в 8 раз крови переносят в центрифужную пробирку и приливают к ней 1,0 мл 20% -ной ТХУ. Пробу тщательно перемешивают и оставляют в холодильнике на 15-20 минут.

5.3. Пробы вынимают из холодильника и центрифугируют 15 минут при 3000 об/мин и 0-4° С.

5.4. В две химические пробирки наливают по 0,5 мл фосфатного буфера и в каждую добавляют по 1,0 мл надосадочной жидкости.

5.5. В опытную пробирку N 1 приливают 0,05 мл раствора реактива Элмана, а в контрольную пробирку N 2 - 0,05 мл метанола. Содержимое пробирок хорошо перемешивают.

5.6. Измеряют оптическую плотность опытной и контрольной проб против фосфатного буфера при 412 нм в 10 мм-вой кювете.

### 6. Расчет результатов.

Концентрацию восстановленного глутатиона рассчитывают по формуле (20):

$$C = \frac{E_o - E_k * 72,6 * 10^3}{13,1 * 10^3}, \quad (20)$$

где С - содержание восстановленного глутатиона, мМ/л;

$E_o$  - оптическая плотность опытной пробы;

$E_k$  - оптическая плотность контрольной пробы;

$13,1 * 10^3$  - коэффициент молярной экстинкции ТНФА при 412 нм;

72,6 - фактор разведения.

### 7. Примечания.

7.1. Исследование необходимо проводить как можно быстрее после взятия крови. При необходимости транспортировки проб кровь рекомендуется замораживать.

7.2 Реактив Элмана необходимо приливать к буферу как можно быстрее после внесения в него супернатанта (п. 5.4 и п. 5.5).

### Антиокислительная активность плазмы крови

При развитии недостаточности одного или нескольких звеньев антиоксидантной системы ткани утрачивают защиту от действия свободных

радикалов, что приводит к повреждению тканей и органов и развитию заболевания. Для оценки состояния антиоксидантной системы организма определяют общую антиокислительную активность (ОАА) плазмы крови.

1. Принцип метода. Метод основан на регистрации скорости восстановленной формы окисления 2,6 – Дихлорфенолиндофенола бесцветная лейкоформа (2,6-ДХФИФ) кислородом, растворенным в реакционной среде. При этом 2,6-ДХФИФ переходит в форму окрашенную имеющую максимум поглощения при 600 нм

## 2. Реактивы:

2.1. 0,25 М фосфатный буфер, рН 7,4 (7,8 г  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  растворяют в 100 мл дистиллированной воды - раствор № 1; 11,4 г  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$  растворяют в 100 мл дистиллированной воды - раствор №2. К 81 мл раствора №2 приливают 19 мл раствора № 1 и измеряют рН на рН-метре. Доводят объем до 200 мл дистиллированной водой).

2.2. 0,8 мМ водный раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола в окисленной форме (11,6 мг 2,6-ДХФИФ растворяют в 50 мл дистиллированной воды). Раствор готовится за сутки до проведения анализов.

2.3. 3,2 мМ раствор закисного сернокислого железа (44,5 мг  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  растворяют в 50 мл дистиллированной воды). Раствор готовится непосредственно перед проведением анализов.

## 3. Оборудование и аппаратура.

3.1. Спектрофотометр с термостатируемой кюветой.

3.2. Ультратермостат.

3.3. Водяная баня.

3.4. Весы аналитические.

3.5. Колбы мерные.

3.6. Пипетки измерительные.

Микропипетки или микрошприц на 10 и 20 мкл.

## 4. Материал для исследования.

Материалом для исследования служит плазма крови.

## 5. Ход определения.

5.1. В термостатируемую кювету (37,5 °С) последовательно добавляют 0,5 мл фосфатного буфера рН= 7,4; 0,15 мл раствора 2,6-ДХФИФ; 0,15 мл раствора закисного сернокислого железа и быстро перемешивают. Все растворы должны иметь температуру 37°С.

5.2. Сразу после перемешивания быстро добавляют 10 или 20 мкл плазмы крови, перемешивают и через каждые 30 сек (по секундомеру) после добавления плазмы на протяжении 5 мин измеряют оптическую плотность при 600 нм против воды ( $D_{50п}$ ).

5.3. Определяют скорость окисления 2,6-ДХФИФ в реакционной среде по п. 5.1 и 5.2, но вместо плазмы крови добавляют такой же объем дистиллированной воды ( $D_{5к}$ ).

5.4. Определяют оптическую плотность при 600 нм инкубационной среды, в которой 2,6-ДХФИФ окислен полностью. Для этого в кювету



добавляют те же компоненты, но вместо раствора FeSO<sub>4</sub> и пробы, добавляют равные им объемы дистиллированной воды (D<sub>макс</sub>).

#### 6. Расчет результатов.

Определяют значение констант скоростей окисления 2,6 - ДХФИФ в контроле и опыте по формулам (21, 22):

$$K_{\text{контр}} = \frac{\ln D_{\text{макс}} - \ln (D_{\text{макс}} - D_{5\text{к}})}{5} \quad (21)$$

$$K_{\text{оп}} = \frac{\ln D_{\text{макс}} - \ln (D_{\text{макс}} - D_{5\text{оп}})}{5} \quad (22)$$

Рассчитывают константу ингибирования (K<sub>и</sub>) плазмой крови окисления 2,6-ДХФИФ, являющуюся показателем ее антиокислительной активности по формуле (23):

$$K_{\text{и}} = \frac{K_{\text{к}} - K_{\text{оп}}}{C} \quad (23)$$

K<sub>и</sub> - антиокислительная активность плазмы крови, л\* мл<sup>-1</sup> \* мин<sup>-1</sup>; K<sub>к</sub> - константа скорости окисления 2,6-ДХФИФ в контроле; K<sub>оп</sub> - константа скорости окисления 2,6-ДХФИФ в опыте; C - концентрация плазмы в инкубационной смеси, мл/л

#### 7. Примечания.

7.1. Плазма крови должна быть без следов гемолиза.

7.2. Исследование должно проводиться не позднее 6 часов после взятия крови.

Контрольные вопросы:

1. Что занимает центральное место в ферментативном звене антиоксидантной защиты организма животных?

2. Какими тремя способами витамин Е (альфа-токоферол) осуществляет свою антиоксидантную функцию в сыворотке крови?

3. В чем заключается основная функция токоферола?

4. Назовите функции глутатиона в крови?

5. На чем основан метод определения антиокислительной активности плазмы крови?

#### 9.4. Хемилюминесцентный анализ

Хемилюминесцентный анализ основан регистрации свечения в видимой области спектра, возникающего в ходе химических реакций, сопряженных с переходом электронновозбужденного продукта в основное состояние с выделением кванта света. Это сравнительно новая область исследований. ХЛ

- анализ отличается высокой чувствительностью, дешевизной и простотой выполнения, не требует дефицитных реактивов и особо сложной аппаратуры.

Методика хемилюминесцентного анализа:

1. Экспериментальные процедуры. Кровь собирают в пробирку с гепарином в качестве антикоагулянта (из расчета 1 ед/мл крови). Разведенную кровь хранят при температуре тающего льда. Анализ проводят не позднее 2-3 часов после забора крови.

2. Реагенты. Среда для измерения: готовый раствор Хенкса без фенолового красного. Маточный раствор люминола в концентрации  $10^{-12}$  М готовят на дистиллированной воде при нейтральных значениях pH. Поэтому полного растворения красителя добиваются, подщелачивая раствором NaOH и подогревая на водяной бане. Когда люминол растворился, доводят pH раствора до 7,4 соляной кислоты. Хранят в темной посуде в холодильнике в течение 2-3 месяцев. Перед измерением разводят люминол

средой до конечной концентрации  $10^{-5}$  (смешивают одну часть маточного раствора с 1000 мл частями среды измерения).

3. Активирующий агент. В качестве активаторов можно использовать частицы кварца, латекса и др. К 50 мг частиц кварца (латекса) добавляют 100 мл воды и кипятят 20-25 минут. Осаждают центрифугированием при 1500 об/мин в течение 20 минут, высушивают остаток в сушильном шкафу при  $T = 150-200^{\circ} C$ . Непосредственно перед началом работы готовят навеску 20 мг пыли и добавляют к ней 2мл физиологического раствора. Взвесь постоянно перемешивают на магнитной мешалке.

4. Процедура измерения. Наливают в измерительную кювету 3-5 мл при  $T = 37^{\circ} C$ , добавляя в кювету разведенную кровь – 500 мкл. Измеряют интенсивность активированной хемилюминесценции В (мВ) до того момента когда, пройдя максимальную величину, она упадет до  $\frac{1}{2}$  от максимальной интенсивности. Время измерения может колебаться.

5. Обработка результатов. А, мкВ – интенсивность спонтанной хемилюминесценции характеризует исходный уровень окислительного метаболизма клеток. Острые воспалительные процессы (бактериальная инфекция, аллергическая реакция), резко повышают уровень спонтанной хемилюминесценции полиморфноядерных и мононуклеарных лейкоцитов в 10 и более раз по сравнению с нормой. Напротив, затянувшиеся процессы (хроническая пневмония, бронхит, активный гепатит) или терминальное состояние характеризуются снижением уровня спонтанного свечения в (2-3 и более раз). Формула (24):

$$I_a = \frac{B}{A} \quad (\text{относительный индекс активации клеток}), \quad (24)$$

$I_a$ - индекс активации клеток; В- хемилюминесценция после введения активирующего агента; А – интенсивность спонтанной хемилюминесценции.

Контрольные вопросы:

1. На чем основан хемилюминесцентный анализ?
2. Перечислите методику хемилюминесцентного анализа

## 10. ПОКАЗАТЕЛИ БЕЛКОВОГО, ЖИРОВОГО, УГЛЕВОДНОГО И МИНЕРАЛЬНОГО ОБМЕНОВ

**Мочевина** - основной конечный продукт азотистого обмена. Синтезируется главным образом в печени. Непосредственный предшественник мочевины в печени - гуанидиновая группировка аминокислоты аргинина. На долю мочевины приходится не менее половины остаточного азота крови и 80-83% мочи. Значительное повышение содержания мочевины (уремия) в крови наблюдается при циркуляторной недостаточности почек, в результате которой нарушается фильтрация в клубочках. Такая патология возникает при сердечной недостаточности и дегидратации. Уремией сопровождается почечная недостаточность. Повышение мочевины в крови возникает в результате нарушения выделительной функции почек, а также при белковом перекорме. Уменьшение содержания мочевины в крови бывает при длительном белковом недокорме, при нарушении мочевинообразовательной функции печени.

### *Определение мочевины в сыворотке крови по цветной реакции с диацетилмонооксимом*

#### Принцип.

Мочевина в кислой среде образует с диацетилмонооксимом в присутствии тиосемикарбозиды и солей железа окрашенное соединение, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию мочевины в сыворотке крови или моче.

#### Реактивы.

1. трихлоруксусная кислота - 100 г/л.
2. диацетилмонооксим - 25 г/л воды. Реактив стабилен при хранении в темной посуде.
3. 0,25%-ный раствор тиосемикарбозиды (или 0,32%-ный раствор тиосемикарбозиды гидрохлорида). Реактивы устойчивы при хранении в посуде из темного стекла.
4. серная кислота концентрированная.
5. 85%-ная ортофосфорная кислота.
6. железа хлорат.
7. основной раствор железа хлората - 5 г хлорного железа растворяют и доводят дистиллированной водой до 100 мл, затем прибавляют 1 мл концентрированной серной кислоты.
8. рабочий раствор железа хлората - 1 мл основного раствора железа хлората доводят до 100 мл дистиллированной водой, добавляют 8 мл концентрированной серной кислоты и 1 мл 85%-ной ортофосфорной кислоты. Хранят в темной посуде. Реактив годен в течение 2 недель.
9. цветной реактив - к 30 мл рабочего раствора железа хлората добавляют 20 мл дистиллированной воды, 1 мл 2,5%-ного раствора диацетилмонооксима и 0,25 мл 0,25%-ного раствора тиосемикарбозиды. Цветной реактив готовят каждый раз перед употреблением.

10. калибровочный раствор мочевины (25 мг%) - 250 мг мочевины (х.ч.), высушенной в сушильном шкафу при 105<sup>0</sup> С до постоянной массы, 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 нагревают 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 ином случае требуется приготовить новый стандартный раствор.

#### Оборудование.

Фотоэлектроколориметр; водяная баня; центрифуга; центрифужные пробирки; алюминиевая фольга.

#### Ход определения.

1. 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 мин<sup>-1</sup>. 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 затем охлаждают в течение 2 - 3 мин под струей водопроводной воды. Измерения проводят на ФЭКе при длине волны 530 - 560 нм (зеленый светофильтр) против холостой пробы в кювете с толщиной слоя 1 см не позднее чем через 15 мин после охлаждения.

2. Холостую пробу ставят так же, как и опытную, но вместо надосадочной жидкости берут 0,5 мл дистиллированной воды. Одновременно определяют содержание мочевины в стандартной пробе. Стандартную пробу обрабатывают аналогично опытной, но вместо сыворотки берут 0,2 мл стандартного раствора мочевины.

#### Расчет.

Проводят по формуле (25):

$$X = E_{\text{оп}}/E_{\text{ст}} \times 25, \quad (25)$$

где X - концентрация мочевины в сыворотке крови, мг%; E<sub>оп</sub> - экстинкция опытной пробы; E<sub>ст</sub> - экстинкция стандартной пробы; 25 - концентрация мочевины в калибровочном растворе, мг%.

Для перевода мг % в ммоль/л, полученную величину умножают на коэффициент 0,1665. Ошибка метода составляет ± 4%.

**Креатинин** в организме животных и птиц образуется из креатина, источники которого аминокислоты аргинин, глицин, метионин. Креатин при фосфорилировании превращается в креатинфосфат, а затем в креатинин. Концентрация креатинина в крови зависит от образования и выведения. Его образование непосредственно зависит от состояния мышечной массы.

Креатинин удаляется почками посредством клубочковой фильтрации, но, в отличие от мочевины, не реабсорбируется.

Повышение концентрации креатинина в крови наблюдается при почечной недостаточности, прогрессирующих диффузных заболеваниях почек, закупорке мочевых путей, голодании, мышечной дистрофии. При тяжелом нарушении функции почек содержание в крови креатинина может достигать очень высоких цифр.

Понижение количества креатинина не имеет клинического значения.

### ***Определение креатинина в сыворотке крови по цветной реакции Яффе (по методу Лоппера)***

#### Принцип метода.

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

#### Реактивы.

1. Насыщенный раствор пикриновой кислоты. Влажность товарной пикриновой кислоты 15 - 20%. 2 г пикриновой кислоты растворяют в 100 мл горячей (70 - 80<sup>0</sup>С) дистиллированной воды при нагревании в водяной бане. Раствор оставляют стоять на 24 часа, периодически перемешивая, затем фильтруют. Реактив стоек. Хранят в темной посуде.

2. 0,1 моль/л соляной кислоты.

3. Основной калибровочный раствор креатинина, 10 моль/л - 113 мг креатинина доводят до 100 мл 0,1 моль/л раствором соляной кислоты. Хранят в холодильнике в посуде с притертой пробкой.

4. Рабочий калибровочный раствор - получают разведением основного калибровочного раствора дистиллированной водой в 100 раз. 1 мл раствора содержит 0,1 ммоль/л (1 мг%) креатинина.

5. Натрия гидроксид, 2,5 моль/л (10%-ный раствор).

#### Оборудование.

ФЭК; водяная баня; колбы мерные.

#### Ход определения.

1. Опытная проба.

2,0 мл сыворотки смешивают с 6,0 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты. Через 5 мин пробирку помещают на 15 - 20с в кипящую водяную баню, затем центрифугируют или фильтруют. К 4 мл центрифугата добавляют 0,2 мл 2,5 моль/л раствора натрия гидроксида и тщательно перемешивают. Иногда после подщелачивания раствор мутнеет вследствие выпадения фосфатов. В этом случае его следует еще раз отцентрифугировать. Затем раствор доводят до объема 10 мл дистиллированной водой. Через 10 мин (не позже) измеряют на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 2 см при длине волны 500 - 560 нм (зеленый светофильтр) против холостой пробы.

2. Холостая проба.

3 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты и 0,2 мл 2,5 моль/л раствора натрия гидроксида доводят до объема 10 мл водой.

### 3. Калибровочная проба.

Ее обрабатывают точно так же, как и опытную, но вместо сыворотки крови берут 2 мл рабочего 0,1 ммоль/л (мг%) раствора креатинина; пробу при этом не центрифугируют. Можно строить калибровочный график по таблице 3.

Таблица 3 – Калибровочная проба

№ п/п	Рабочий калибровочный раствор, мл	Раствор пикриновой кислоты, мл	2,5 ммоль/л раствор Натрия гидроксида, мл	Дистиллированная вода, мл	Концентрация креатинина мкмоль/л
1	0,4	3,0	0,2	До объема 10 мл	40
2	0,8	3,0	0,2	До объема 10 мл	80
3	1,6	3,0	0,2	До объема 10 мл	160
4	2,4	3,0	0,2	До объема 10 мл	240
5	3,2	3,0	0,2	До объема 10 мл	320

Через 10 мин проводят измерения при тех же условиях, что и опытные пробы. Калибровочная кривая линейна до 260 мкмоль/л креатинина.

#### Расчет.

Концентрацию креатинина в сыворотке определяют по формуле (26):

$$X = E_{\text{оп}}/E_{\text{к}} \times 0,1 \text{ или } X = E_{\text{оп}}/E_{\text{к}} \times 1 \quad (26)$$

где X - содержание креатинина в сыворотке, ммоль/л или мг%;

$E_{\text{оп}}$  - экстинкция опытной пробы;

$E_{\text{к}}$  - экстинкция калибровочной пробы;

0,1 - концентрация креатинина в калибровочной пробе, ммоль/л;

1 - концентрация креатинина в калибровочной пробе, мг%.

**Аспаратаминотрансфераза (АсАТ)** в сыворотке катализирует перенос аминогруппы с аспарагиновой кислоты на альфа-кетоглутаровую кислоту. АсАТ широко распространена в тканях (сердце, печень, скелетная мускулатура, почки, поджелудочная железа и др.) и имеет митохондриальный и цитоплазматический изоферменты. Наиболее резкие изменения в активности АсАТ наблюдают при поражении сердечной мышцы. Она повышается также при остром гепатите и других тяжелых поражениях гепатоцитов. Умеренное увеличение наблюдается при механической желтухе и циррозе печени.

**Аланинаминотрансфераза (АлАт)** в сыворотке катализирует перенос аминогруппы с аланина на альфа-кетоглутаровую кислоту (кетокислота). Она содержится в скелетных мышцах, печени, сердце. В сердечной мышце ее значительно меньше, чем АсАТ. В меньших количествах АлАТ

обнаружена также в поджелудочной железе, селезенке. Самых больших концентраций АЛТ достигает в печени.

### **Определение активности аспартатаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы.**

Принцип методов определения АсАТ И АлАТ заключается в том, что в результате переаминирования, происходящего под действием аминотрансфераз образуются щавелевоуксусная и пировиноградная кислоты. При добавлении 2,4 – динитрофенилгидразина в щелочной среде образуются окрашенные гидразоны пировиноградной и щавелевоуксусной кислот.

#### Реактивы.

1. 0,1 моль раствор фосфатного буфера,  $pH = 7,4$  (14,2 г  $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$  доводят дистиллированной водой до 1000 мл., 13,6 г  $KH_2PO_4$  доводят до 1 л дистиллированной водой. Смешивают 840 мл 0,1 моль раствора  $Na_2HPO_4$  и 160 мл 0,1 моль раствора  $KH_2PO_4$ , величину  $pH$  буфера доводят до 7,4 с помощью  $pH$ -метра).

2. Субстратный раствор для определения активности аспартатаминотрансферазы: 29,2 мг  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты и 2,66 г ДЛ-аспарагиновой кислот растворяют в 1 н растворе  $Na OH$ . Едкий натр прибавляют осторожно, до получения  $pH=7,4$ . Объем доводят до 100 мл фосфатным буфером.

3. 1 н раствор  $Na OH$ .  $\rightarrow$  4 г  $Na OH$  растворяют в 100 мл дистиллированной воды.

4. Раствор 2,4-динитрофенилгидразин.  $\rightarrow$  19,8 мг 2,4-динитрофенилгидразина растворяют в 1 н растворе соляной кислоты. Доводят объем до 100 мл.

5. 0,4 н раствор  $Na OH$ .  $\rightarrow$  16 г  $Na OH$  растворяют в 1000 мл дистиллированной воды.

6. Стандартный раствор пировинограднокислого натрия, для приготовления калибровочного раствора (11 мг кристаллического пирувата натрия растворяют в 100 мл дистиллированной воды. 1 мл раствора содержит 10 мкг пирувата натрия, что соответствует 88 мкг или 1 мкмолью пировиноградной кислоты).

#### Количество необходимых реактивов на 100 анализов.

1. Субстратный раствор - 40 мл.
2. Раствор 2,4-динитрофенилгидразина - 40мл.
3. 0,4 н раствор  $Na OH$  - 300 мл.
4. Стандартный раствор пировиноградной кислоты - 2 мл.

#### Специальное оборудование.

1. Спектрофотометр.
2. Весы аналитические.
3. Ультратермостат.
4. Секундомер.
5.  $pH$ -метр.
6. Холодильник бытовой.



7. Пробирки Флоринского.
8. Дозатор.
9. Колбы мерные 100, 500, 1000 мл.
10. Унипипетки на 50, 100, 250, 500 мкл и наконечники к ним.
11. Флаконы на 100, 500, 1000 мл.
12. Штатив для пробирок.
13. Бумага фильтровальная.

Материал для исследования.

Материалом для исследования служит сыворотка крови, свободная от гемолиза.

Таблица 5 - Ход определения

№ п/п	Реактивы, мл	Проба	Стандарт	Контроль
1.	Субстрат АсАТ (АлАТ)	0,25	0,25	0,25
Термостатируют 3-5 минут при температуре 37° С				
2.	Сыворотка без гемолиза	0,05	-	-
3.	Стандартный раствор	-	-	0,05
Инкубируют 60 минут при температуре 37° С				
4.	2,4-ДНФГ	0,25	0,25	0,25
5.	Сыворотка	-	0,05	-
Выдерживают 20 минут при комнатной температуре				
6.	0,4 н раствор NaOH	2,5	2,5	2,5

Тщательно перемешивают и оставляют для развития окраски на 10 минут при комнатной температуре.

Спектрофотометрируют при длине волны 530 нм в кювете с толщиной слоя 1 см против холостой пробы.

Холостую пробу ставят так же, как опытную, но сыворотку добавляют после инкубации.

Расчет результатов определения аспартатаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы

Расчет активности фермента в сыворотке крови производят по калибровочной кривой. Из калибровочного раствора готовят ряд разведений, как указано ниже Таблица 6:

Таблица 6 - Расчет активности фермента в сыворотке крови

№ п/п	Калибровочный. р-р, мл	Вода, мл	Пируват		Активность фермента, нмоль/с*л	
			Мкг	мкмоль	АсАТ	АлАТ
1.	0,05	0,55	4,4	0,05	139	278
2.	0,1	0,5	8,8	0,1	278	556
3.	0,15	0,45	13,2	0,15	417	834
4.	0,2	0,4	17,6	0,2	556	1112
5.	0,25	0,35	22,0	0,25	695	1390

Калибровочные пробы ставят так же, как опытные, но вместо сыворотки добавляют разведенные калибровочные растворы. Измеряют против холостой пробы, в которую вместо калибровочных растворов добавляют воду. Калибровочная кривая линейка до величины экстинции 0,3.

**Щелочная фосфатаза** широко распространена в тканях, особенно в слизистой оболочке кишечника, остеобластах, стенках желчных протоков печени. Фермент расположен на клеточной мембране и принимает участие в транспорте фосфора. Для диагностических целей чаще всего проводят определение активности костной и печеночной форм фосфатазы. Костная щелочная фосфатаза продуцируется остеобластами - крупными одноядерными клетками, лежащими на поверхности костного матрикса в местах интенсивного формирования кости. Видимо, благодаря внеклеточному расположению фермента в процессе кальцификации можно проследить прямую связь между заболеванием кости и появлением фермента в сыворотке крови. Увеличение активности щелочной фосфатазы сопровождается рахит любой этиологии. Значительное увеличение активности щелочной фосфатазы наблюдается при холестазах, остеодистрофии, кишечных бактериальных инфекциях. Снижение активности фермента отмечается при выраженной анемии, гипотериозе.

Принцип метода определения основан на том, что под действием щелочной фосфатазы происходит гидролиз бета-глицерофосфата с освобождением неорганического фосфора. Активность фермента пропорциональна количеству выделившегося неорганического фосфора.

**Определение активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови (по Бессею, Лоури и Броку)**

Метод основан на способности ферментов гидролизовать эфирную связь в р-нитрофенилфосфате. Освобождающийся р-нитрофенол в щелочной среде дает желтое окрашивание. Интенсивность окраски отражает активность фермента.

**Реактивы:** 1) субстратно-буферный раствор для определения активности щелочной фосфатазы (0,05 М глициновый буфер и  $5,5 \times 10^{-3}$  М раствор р-нитрофенилфосфата, рН 10,5): растворяют 375 мг глицина, 10 мг  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  и 165 мг р- нитрофенилфосфата (натриевой соли) в 42 мл 0,1 н. раствора едкого натра и доводят объем бидистиллированной водой до 100 мл. Проверяют рН раствора с помощью потенциометра. Раствор сохраняют в склянке темного стекла при 0- 4° С в течение недели;

2) субстратно-буферный раствор для определения активности кислой фосфатазы (0,05 М цитратный буфер и  $5,5 \times 10^{-3}$  М раствор р-нитрофенилфосфата, рН 4,8): растворяют 0,41 г лимонной кислоты, 1,125 г лимоннокислого натрия и 165 мг р-нитрофенилфосфата (натриевой соли) в 100 мл бидистиллированной воды. Хранят, как предыдущий раствор;

3) стандартный раствор-нитрофенола ( $5 \times 10^{-5}$  М): растворяют 696 мг р-нитрофенола в 0,02 н. растворе едкого натра и доводят этим же раствором объем до 1000 мл. 10 мл этого раствора доводят с помощью 0,02 н. раствора едкого натра до 1000 мл:

4) 0,1 н. и 0,02 н. растворы едкого натра.

**Ход определения.** В две параллельные пробирки вносится по 1 мл. субстратно- буферного раствора (опыт и контроль). Обе пробирки прогревают в водном термостате в течение 5—10 мин при 37° С, затем в опытную пробирку добавляют сыворотку 0,1 мл. Пробирки перемешивают и инкубируют в течение 30 мин при 37° С. Затем опять в обе пробирки добавляют по 10 мл 0,02 н. NaOH, а сыворотку добавляют в контроль (0,1 мл). Перемешивают и затем фотометрируют на фотоэлектроколориметре при длине волны 405 нм (390—420 нм) в кювете толщиной 1 см против контроля.

**Расчет.** Активность фермента выражают либо количеством микромолей р-нитрофенола, освобожденного под влиянием 1мл сыворотки крови за 1мин при 37° С, либо в условных единицах. За единицу активности принимают такое количество фермента, которое освобождает 0,05 мкМ р-нитрофенола в условиях опыта (0,1мл сыворотки, конечный объем исследуемого раствора 11,1 мл, время инкубации 30 мин).

Построение калибровочной кривой. 1; 2; 3; 5 и 7 мл стандартного раствора р-нитрофенола (п. 3), содержащего соответственно 0,05; 0,10; 0,15; 0,25; 0,35 мкМ, с помощью 0,02 н. раствора едкого натра доводят до объема 11,1 мл и измеряют оптическую плотность против 0,02 н. раствора едкого натра. Строят кривую, откладывая на оси ординат значения экстинкции, а на оси абсцисс — количество микромолей р-нитрофенола.

**Определение щелочной фосфатазы в сыворотке крови птиц (по методике ВНИИТИП, 1998).**

**Принцип метода.** Определение активности фосфатазы основано на способности ее при рН=8,6 и температуре 37° С отщеплять неорганический фосфор от сложного эфира бета-глицерофосфата натрия. С повышением активности фермента увеличивается количество отщепляемого фосфора. Активность щелочной фосфатазы выражается в условных единицах. Одна единица Бодански соответствует 1 мг фосфора, отщепляемого в течение 1

часа под действием фермента, содержащегося в 100 мл сыворотки. Следовательно, определяется неорганический фосфор в сыворотке крови до и после инкубации ее с бета-глицерофосфатом натрия.

Реактивы. Бета-глицерофосфатный субстрат для щелочной фосфатазы: 2,5 г бета-глицерофосфата и 2,12 г вероната натрия (мединала) растворяют дистиллированной водой в мерной колбе на 500 мл, доводят до метки (хранить под толуолом или хлороформом в холодильнике). Раствор трихлоруксусной кислоты 20%-ный: 20 г трихлоруксусной кислоты растворяют в 80 мл дистиллированной воды.

Реактив на фосфор. Смешивают 500 мл 0,234%-ного раствора ванадиево-кислого аммония (№ 1), 1000мл 2,5 н. раствора соляной кислоты (№ 2) и 1000 мл 3,53%-ного раствора молибденово-кислого аммония (№ 3). Для приготовления раствора № 1 навеску ванадиево-кислого аммония 2,34 г растворяют в 500 мл горячей дистиллированной воды, добавляют 23 мл концентрированной соляной кислоты, охлаждают и объем в мерной колбе на 1 л доводят до метки дистиллированной водой. Для приготовления раствора № 2 наливают 205,7 мл концентрированной соляной кислоты в мерную колбу на 1 л и объем доводят до метки дистиллированной водой. Раствор №3: 35,3 г молибденово-кислого аммония растворяют в 700-800 мл горячей воды, охлаждают и объем в мерной колбе на 1 л доводят до метки дистиллированной водой.

Основной стандартный раствор фосфора. Навеску 4,394 г однозамещенного фосфорнокислого калия растворяют в мерной колбе на 1 л и объем доводят до метки: в 1 мл раствора содержится 1 мг фосфора. 5 мг%-ный рабочий раствор фосфора: в мерную колбу на 100 мл наливают 5 мл основного раствора и объем доводят до метки дистиллированной водой.

Проведение анализа. В центрифужную пробирку наливают 2,5 мл глицерофосфатного субстрата, 0,5 мл сыворотки и инкубируют в течение 1 часа в термостате при температуре 37,6<sup>0</sup> С, затем добавляют 2 мл 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, перемешивают и центрифугируют.

Во вторую центрифужную пробирку наливают 2,5 мл глицерофосфатного буфера, 0,5 сыворотки и 2 мл 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, перемешивают и центрифугируют. Из первой и второй пробирок берут по 2,5 мл центрифугата, прибавляют 2,5 мл реактива на фосфор (стоит при комнатной температуре 2 часа), по истечении 2 часов колориметрируют на ФЭКе: со светофильтром № 3 (фиолетовый), кювета № 10, длина волны 400 нм. В третью пробирку приливают 2,5 мл глицерофосфатного буфера, 0,5 мл рабочего раствора фосфора, 2 мл 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, перемешивают, отбирают 2,5 мл, прибавляют сюда же 2,5 мл реактива на фосфор и через 2 часа колориметрируют. Таким же образом обрабатывают контрольную пробирку, но вместо стандарта берут 0,5 мл воды. Содержание щелочной фосфатазы вычисляют по формуле (27):

$$\text{АЩФ} = X_2 - X_1 \quad (27)$$

где  $X_1$  и  $X_2$  - количество неорганического фосфора, содержащегося в 100 мл сыворотки до и после инкубации, мг.

Его определяют по формулам (28) и (29):

$$X_1 = 5 \cdot A_1 : B \quad (28)$$

$$X_2 = 5 \cdot A_2 : B \quad (29)$$

где  $A_1$  и  $A_2$  - оптическая плотность исследуемой пробы до и после инкубации;  $B$  - оптическая плотность пробы с рабочим раствором; 5 - коэффициент для 5 мг%-ного рабочего раствора.

В крови здоровой птицы содержится примерно 10-11 единиц фермента. Повышение щелочной фосфатазы за пределы этих величин указывает на дефицит витамина D в организме. При начальной стадии гиповитаминоза D в сыворотке крови кур-несушек содержится 15-20, а у тяжело-больных - до 50 и более единиц щелочной фосфатазы.

**Холестерин** в сыворотке крови животных находится в двух формах: свободной (1/3) и эфирносвязаной с различными жирными кислотами (2/3). С возрастом концентрация холестерина увеличивается. Холестерин (ХС) является вторичным одноатомным циклическим спиртом. ХС поступает в организм с пищей, но большая часть его образуется эндогенно (синтезируется в печени). Холестерин является компонентом клеточных мембран, предшественником стероидных гормонов и желчных кислот. Гиперхолестеринемия отмечается при нефрозах, пониженной функции щитовидной железы, в начале голодания, у птиц - при скармливании рационов, обогащенных твердыми кормовыми жирами. При острых гепатитах уровень общего холестерина в начале заболевания обычно повышается, а затем падает ниже нормы. Для заболевания печени характерно падение эфирной фракции холестерина. Острое падение этой фракции в крови - плохой прогностический признак, указывающий на острую атрофию печени или острое отравление ее.

В норме доля эфирносвязанного холестерина в сыворотке крови у птиц достигает 60 - 70%. В результате все изменения его содержания отражают главным образом состояние печени и поджелудочной железы, где синтезируется эта фракция. Снижение данной фракции часто является следствием поражения синтетической функции печени.

**Определение содержания общего холестерина в сыворотке крови по Ильку**

Принцип метода.

В основу метода положена модифицированная Ильком реакция Любермана - 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. Для этого колбу, в которой готовят реактив, помещают в сосуд со льдом, а серную кислоту добавляют в последнюю очередь медленно по каплям, постоянно помешивая. Смесь должна быть бесцветной или слегка желтого цвета и сохраняться в холодильнике.

2. Стандартный раствор холестерина: 100 мг холестерина в 100 мл хлороформа.

Оборудование. ФЭК или спектрофотометр; термостат; пробирки; штатив для пробирок; пипетки мерные на 0,1 и 5 мл.

#### Ход определения.

К 2 мл реактива 1 добавляют 0,1 мл негемолизированной сыворотки, встряхивают короткими энергичными движениями и помещают на 20 мин в термостат при 37° С. Окрашенную в зеленый цвет жидкость колориметрируют на спектрофотометре (длина волны 650 - 660 нм) или на ФЭКе (красный светофильтр) в кюветах диаметром 0,5 см против контрольной пробы на реактивы (вместо сыворотки вносят 0,1 мл дистиллированной воды).

#### Расчет.

1. Ведут 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; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 и 3 мл рабочего раствора, что соответствует 0,025; 0,05; 0,10; 0,20; 0,25 и 0,30 мг холестерина. В седьмую 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.

2. При постановке реакции используют абсолютно чистые и совершенно сухие пипетки и пробирки. Соотношение ингредиентов реактивов рассчитано так, что белки сыворотки не выпадают в осадок. Появление муты может быть вызвано только наличием воды в реактиве или посуде.

3. При исследовании холестерина в экстракте липидов его вносят в пробирку в объеме, содержащем не более 1 - 5 мг чистых липидов.

#### Массовая концентрации холестерина и триглицеридов в сыворотке (плазме) крови

1. Триглицериды (ТГ), или нейтральные жиры, — сложные эфиры трехатомного спирта глицерина и высших жирных кислот. ТГ поступают в организм с пищей (экзогенные ТГ) и синтезируются в организме (эндогенные ТГ). Последние образуются в печени главным образом из

углеводов. ТГ являются главной формой накопления жирных кислот в организме и основным источником энергии.

2. Общий холестерин (ХС) в сыворотке является вторичным одноатомным циклическим спиртом. ХС поступает в организм с пищей, но большая часть его образуется эндогенно (синтезируется в печени). Холестерин является компонентом клеточных мембран, предшественником стероидных гормонов и желчных кислот.

Принцип метода определения основан на специфическом взаимодействии флуоресцентных органических соединений с липопротеидами крови. В результате этого взаимодействия интенсивность флуоресценции возрастает по мере роста объема ХС и ТГ, переносимых в крови атерогенными липопротеинами низкой плотности. Таким образом, по интенсивности флуоресценции определяют суммарный липидный показатель ХС+ТГ.

**Билирубин** - желчный пигмент, образующийся в клетках ретикулоэндотелиальной системы печени и селезенки при распаде гемоглобина, миоглобина, цитохромов. Он ядовит, плохо растворим в воде. При поступлении с кровью в печень в гепатоцитах происходит обезвреживание его путем присоединения глюкуроновой кислоты. Соединения билирубина с глюкуроновой кислотой 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. Повышение содержания билирубина в сыворотке крови (гипербилирубинемия) отмечается при гепатите, циррозе печени, острой токсической гепатодистрофии, опухолях печени. При этих болезнях увеличивается уровень в крови как несвязанного, так и связанного билирубина. Увеличение содержания билирубина в крови может обуславливаться:

1. Увеличение интенсивности гемолиза эритроцитов.
2. Поражение паренхимы печени с нарушением ее билирубин выделительной функции.
3. Нарушение оттока желчи из желчных путей в кишечник.
4. Нарушение печеночной секреции прямого билирубина в желчь.

Содержание билирубина в крови может быть уменьшено при низком гемолизе, что наблюдается при анемиях и дистрофии. Уменьшение содержания билирубина диагностического значения не имеет.

***Определение билирубина в сыворотке крови по диазореакции методом Ендрассика - Клеггорна - Грофа***

Принцип метода.

Под действием соляной кислоты разрывается тетрапирроловая связь билирубина и образуется два дипиррола, которые диазотируются диазобензосульфоновой кислотой с образованием розово-фиолетового азобилирубина. Связанный билирубин реагирует быстро, несвязанный - после добавления кофеинового реактива.

### Реактивы.

1. Кофеиновый реактив - 5 г чистого кофеина, 7,5 г натрия бензоата, 12,5 г натрия ацетата растворяют в 90 мл дистиллированной воды, нагревают до 50 - 60°C, хорошо перемешивают. После охлаждения доводят дистиллированной водой до 100 мл. Срок хранения - 2 недели.

2. Натрия хлорид - ч.д.а. или х.ч., 154 моль/л. 0,9 г натрия хлорида помещают в мерную колбу на 100 мл и доводят водой до метки.

3. Соляная кислота концентрированная - ч.д.а. или х.ч.

4. Сульфаниловая кислота - ч.д.а.

5. Диазореактив I - 5 г сульфаниловой кислоты растворяют при нагревании в 300-400 мл дистиллированной воды, прибавляют 15 мл концентрированной HCl (плотностью 1,19 кг/м<sup>3</sup>). Если сульфаниловая кислота полностью не растворяется, колбу помещают в теплую воду и помешивают. Только после полного растворения сульфаниловой кислоты и охлаждения раствор доливают дистиллированной водой до 1 литра. Реактив стойкий, хранят в посуде из темного стекла.

6. Диазореактив II - натрия нитрит (ч.д.а., х.ч.), 5 г/л (0,07 моль/л). 0,5 г нитрита натрия помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят водой до метки. Реактив стабилен в течение 2 недель при хранении в посуде из темного стекла. Перед работой смешивают 10 мл диазореактива I и 0,3 мл диазореактива II.

7. Билирубин - для построения калибровочного графика, 800 мг/л, или 1368 мкмоль/л. Коммерческие препараты кристаллического билирубина содержат разные примеси, которые могут мешать реакции азосочетания. Рекомендуется использовать наборы отечественных или зарубежных фирм, содержащие билирубин высокой степени чистоты. Растворы билирубина нестойкие, поэтому их готовят с добавлением белка в качестве стабилизатора.

8. Натрия карбонат - 0,1 моль/л. 10,6 г безводного натрия карбоната растворяют и доводят до 1 л дистиллированной водой.

9. Уксусная кислота - 4 моль/л, 25 мл ледяной уксусной кислоты доводят до 100 мл дистиллированной водой.

Оборудование. Фотоэлектроколориметр; колбы мерные.

Ход определения.

1. В 3 пробирки (для общего и связанного билирубина и для контроля) вносят реактивы, как указано в таблице 7.



Таблица 7 - Смеси реактивов для определения билирубина в сыворотке крови

Ингредиент	Опытная проба, мл		Холостая проба, мл
	общий билирубин	связанный билирубин	
Сыворотка крови негемогинезированная	0,5	0,5	0,5
Кофеиновый реактив	1,75	$\frac{3}{4}$	1,75
Натрия хлорид 0,9 %	$\frac{3}{4}$	1,75	0,25
Диазосмесь	0,25	0,25	$\frac{3}{4}$

2. Для определения связанного билирубина измерение на ФЭКе проводят через 5 - 10 мин после добавления диазосмеси, т. к. при длительном стоянии в реакцию вступает несвязанный билирубин. Для определения общего билирубина пробу для развития окраски оставляют на 20 мин, после чего измеряют на ФЭКе. В дальнейшем окраска не изменяется.

3. Измерение проводят 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 связанного билирубина, вычитают показатель контроля.

#### Расчет.

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

#### Способ 1.

Калибровочный график строят по способу Шелонга - Венде с использованием стабилизирующего свойства белка сыворотки крови.

Реактивы для построения калибровочного графика.

#### 1. Основной раствор билирубина.

Препараты кристаллического билирубина отличаются по своим свойствам. Не каждый билирубин может быть использован для построения калибровочного графика. Допустим лишь тот билирубин, 1мг%-ный раствор которого при растворении в хлороформе (для наркоза) при 25°C дает на спектрофотометре абсорбцию от 1,01 до 1,07 при длине волны 453 нм в кювете с толщиной слоя 1 см.

В кювете вместимостью 50 мл растворяют 40 мг билирубина (имеющийся в продаже билирубин является непрямореагирующим) в 30 - 35 мл 0,1 моль/л раствора карбоната натрия (10,6 г безводного  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  доводят до 1 л дистиллированной водой) и хорошо перемешивают, не допуская образования пузырьков. Доводят до 50 мл 0,1 моль/л раствором  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  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 раствора билирубина и 0,1 мл (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. Он содержит на 10мг% билирубина больше, чем сыворотка, взятая для приготовления раствора. Чтобы исключить при расчетах количество билирубина, содержащегося в этой сыворотке крови, при измерении на ФЭКе из величины экстинкции калибровочных проб вычитают величины экстинкции соответствующих разведений компенсационной жидкости.

Для приготовления компенсационной жидкости смешивают 13,9 мл той же сыворотки, которая использовалась для приготовления калибровочного раствора билирубина, 2 мг 0,1 моль/л раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  и 0,1 мл 4 моль/л раствора уксусной кислоты. Для построения калибровочного графика готовят ряд разведений с различным содержанием билирубина Таблица 8.

Таблица 8 – Таблица ряда разведений с различным содержанием билирубина

№ Пробирки	Рабочий раствор билирубина, мл	0,9 %-ный раствор натрия хлорида, мл	Количество билирубина в пробе		Концентрация билирубина в сыворотке крови, мкмоль/л
			мг	мкмоль/л	
1	0,05	0,45	0,005	0,00855	17,1
2	0,1	0,4	0,01	0,0171	34,2
3	0,15	0,35	0,015	0,02565	51,3
4	0,2	0,3	0,02	0,0342	68,4
5	0,25	0,25	0,025	0,04275	85,5

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 натрия гидроксида. Измерение проводят при тех же условиях, что и в опытных пробах, через 20 мин. Из компенсационной жидкости готовят разведения аналогично калибровочным (см. таблицу выше) и далее обрабатывают их так же, как калибровочные пробы.

Разведения билирубина для построения калибровочного графика:

## Способ 2.

Калибровочный график строят по готовым наборам реактивов, выпускаемых отечественными и зарубежными фирмами. Калибровочная кривая линейна до 170 мкмоль/л.

Подбор реактивов в коммерческих наборах основан также на диазореакции, помещенной в основу метода Ендрассика - Клеггорна - Грофа.

### Примечание.

Сыворотка или плазма крови должны быть свежими, свободными от гемолиза, прозрачными. Плазму или сыворотку крови хранят не более двух дней при температуре 4 - 25° С. Исследования проводят незамедлительно. Образцы крови защищают от света.

**Глюкоза** является одним из важнейших компонентов крови; количество ее отражает состояние углеводного обмена. Глюкоза равномерно распределяется между плазмой и форменными элементами крови с некоторым превышением ее концентрации в плазме. Содержание глюкозы в артериальной крови выше, чем в венозной, что объясняется непрерывным использованием глюкозы клетками. Уровень глюкозы в крови регулируется центральной нервной системой, гормональными факторами и функцией печени. Снижение глюкозы в крови (гипогликемия) при недостаточности легкоусвояемых кормов в рационе, остеодистрофии, большой потребности в глюкозе при высококонцентратном типе кормления, преобладании в рационах кислых кормов. Повышение глюкозы в крови (гипергликемия) наблюдается при поражении эндокринной системы, стрессе, скармливании больших количеств сахаристых кормов.

### **Определение глюкозы в крови**

#### Принцип метода

Глюкоза окисляется кислородом воздуха при каталитическом действии глюкозооксидазы с образованием перекиси водорода и глюконолактона. Образовавшуюся перекись водорода определяют по индофеноловой реакции аминокантипирина с хромогеном, катализируемой пероксидазой. Количество образовавшегося красителя при соблюдении рабочих условий пропорционально содержанию глюкозы.

#### Реактивы.

1. 0,5 н раствор едкого натра (20 г едкого натра растворяют в 1 л дистиллированной воды).

2. 10% -ный раствор сернокислого цинка (96 г сернокислого цинка, содержащего 7 молекул воды растворяют в 1 л дистиллированной воды).

3. Диагностический набор фирмы «Лахема» - «Глюкоза».

4. Рабочий раствор: содержимое флаконов «Смесь ферментов», «Хромоген» растворяют примерно в 50 мл бидистиллированной воды, добавляют 18 мл концентрированного буферного раствора и доливают бидистиллированной воды до 500 мл (рН рабочего раствора 8,3). Хранят в темной банке при температуре от 0° С до 10° С.

5. Стандартный раствор глюкозы. Раствор с содержанием глюкозы 25 мМ/л разводят дистиллированной водой в 5 раз (5 мМ/л).

Количество необходимых реактивов на 100 анализов.

1. 0,5 н раствор едкого натра - 60 мл.
2. Раствор сернокислого цинка - 60 мл.
3. Рабочий раствор - 120 мл.
4. Стандартный раствор глюкозы - 5 мл.

Специальное оборудование.

1. Спектрофотометр.
2. Ультратермостат.
3. Центрифуга.
4. Холодильник бытовой.
5. Весы аналитические.
6. рН-метр.
7. Варипипетки (унипипетки) на 1000, 500, 100, 50 мкл и наконечники к ним.
8. Химические пробирки тонкостенные н 10 мл для центрифуги.
9. Пробирки Флоринского.
10. Колбы мерные на 500, 1000 мл.
11. Флакон из темного стекла.
12. Секундомер.
13. Бумага фильтровальная.
14. Штативы для пробирок.
15. Стеклянная палочка.
16. Флаконы на 1 литр.

Материал для исследования.

Материалом для исследования служит цельная кровь.

1. Ход работы с депротеинированием Таблица 9.

Таблица 9 - Ход определения.

№ п/п	Реактивы, мл	Проба	Стандарт	Контроль
1.	0,5 н - раствор едкого натра	0,5	0,5	0,5
2.	цельная кровь	0,5	-	-
3.	стандартный раствор глюкозы	-	0,5	-
4.	дистиллированная вода	1,0	1,0	1,5
5.	10% раствор сернокислого цинка	0,5	0,5	0,5

2. Перед добавлением сернокислого цинка все компоненты № 1-4 тщательно перемешиваются и выдерживаются при комнатной температуре 15-30 минут.

3. Затем приливают реактив № 5 и тщательно перемешивают содержимое пробирок стеклянной палочкой до образования гомогенной смеси и через 30 минут центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 минут. Супернатант должен быть прозрачным.

4. Постановка цветной реакции Таблица 10.

Таблица 10 – Реактивы для постановки цветной реакции

№ п/п	Реактивы, мл	Проба	Стандарт	Контроль
1.	Рабочий раствор	1,0	1,0	1,0
2.	Безбелковый фугат крови	0,1	—	—
3.	Супернатант стандартного Р-ра глюкозы	—	0,1	—
4.	Супернатант контроля	—	—	0,1

Содержимое пробирок перемешивают и инкубируют точно 30 минут при 37° С, после чего сразу же фотометрируют против раствора контроля (сравнения) при 490 нм в 1 см кювете.

Расчеты результатов.

Содержание глюкозы в мМоль/л в пробах рассчитывают по формуле (30):

$$X = E_{оп} * 5 \text{ (мМоль/л)}, \quad (30)$$

Где X - концентрация глюкозы в крови; E<sub>оп.</sub> - экстинкция опытной пробы; E<sub>ст.</sub> - экстинкция стандарта.

Примечания.

1. Постановку цветной реакции проводят приливанием супернатанта к уже отмеренному рабочему раствору, прогретому в течение 5 минут при 37°С.

2. Цветную реакцию ставят сериями по 5-7 проб с интервалом между сериями 5 минут.

3. В первую очередь ставят реакцию с раствором - контроль (сравнение).

4. Правильность приготовления растворов едкого натра и сернокислого цинка проверяют титрованием по фенолфталеину. Нейтрализация должна происходить объём в объём. В случае невозможности доставить кровь в лабораторию не позднее 1 часа с момента взятия, её фиксируют на месте приливанием 0,5 мл крови к 0,5 мл едкого натра.

### **Определение лимонной кислоты в сыворотке крови**

Дефицит витамина D в организме птицы сопровождается резким снижением уровня лимонной кислоты в крови, костях и хрящах, в связи с чем этот показатель используется для диагностики авитаминоза D. В частности, определяют содержание лимонной кислоты в крови.

Метод основан на фотометрическом определении интенсивности окраски при цветной реакции лимонной кислоты с пиридином в уксусном ангидриде.

**Реактивы.** Раствор трихлоруксусной кислоты 5%-ный, уксусный ангидрид безводный, пиридин безводный, стандартный раствор лимонной кислоты в 5%-ном растворе трихлоруксусной кислоты (из основного раствора с содержанием 460 мкг/мл безводной лимонной кислоты готовят серию разведений различной концентрации).

**Проведение анализа.** Анализ ведут в безбелковом экстракте ткани (крови), содержащем 5%-ную трихлоруксусную кислоту. Метод пригоден для анализа других биологических жидкостей.

Пипеткой отмеривают в кювету ФЭКа 1 мл безбелкового экстракта (от 15 до 400 мкг) лимонной кислоты. Сюда же добавляют непосредственно из бюретки 8 мл (точно) уксусного ангидрида, закрывают кювету резиновой пробкой и ставят на водяную баню с постоянным уровнем воды и температурой  $60 \pm 1^\circ\text{C}$ . Через 10 минут в кювету добавляют 1 мл (точно) пиридина, тотчас закупоривают и оставляют в водяной бане на 40 минут, затем переносят на 5 минут в баню с ледяной водой, обтирают насухо и ведут отсчет на ФЭКе (светофильтр № 3, длина волны 420 и 400 нм, кювета № 10).

Для установки прибора проводят опыт с 1 мл 5%-ного раствора трихлоруксусной кислоты вместо исследуемого экстракта крови. Содержание лимонной кислоты находят по стандартной кривой, которую строят по результатам определения в серии разведений стандартного раствора лимонной кислоты. В крови клинически здоровой птицы содержится 5-6 мг % и более лимонной кислоты. При появлении начальных симптомов D-витаминовой недостаточности уровень лимонной кислоты снижается до 2-3 мг % и ниже.

**Фосфор** является один из основных структурных элементов организма. Все виды обмена в организме неразрывно связаны с превращением фосфорной кислоты. Фосфор входит в структуру нуклеиновых кислот, благодаря фосфолированию осуществляется кишечная адсорбция, гликолиз, прямое окисление углеводов. Фосфор принимает активное участие в формировании коллагена - органического матрикса, этому процессу способствует фермент - щелочная фосфатаза, переносящая ионы фосфора к органическому основанию костной ткани (R.P. Miles, 1989). С возрастом снижается содержание неорганического фосфора в сыворотке крови птиц, что связано со снижением фосфатазной активности в крови. Фосфатаза продуцируется главным образом остеобластами, функции которых затухают по мере минерализации (В. Голубятников, С. Коротун, 1994). Фосфор

принимает участие во всех синтетических процессах, входит в состав нуклеиновых кислот, которые служат носителями генной информации. Это единственный элемент, как полагают, влияющий на качество мяса. Благодаря фосфорилированию осуществляется кишечная абсорбция, гликолиз, окисление углеводов, транспорт липидов, обмен аминокислот и т.д. (Н.Н. Альфимов, В.В. Белоусов, 1975). Снижение фосфора в крови (гипофосфатемия) наблюдается при избытке кальция и дефиците витамина Д, отсутствии в рационе подкормок с фосфором, хронической форме остеодистрофии. Повышение уровня фосфора в крови (гиперфосфатемия) бывает при гипофункции паращитовидных желез, гипервитаминозе Д. При характеристике состояния фосфорно-кальциевого обмена необходимо учитывать как количественное содержание в крови этих элементов, так и соотношение между ними.

### ***Определение фосфора в безбелковом фильтрате крови с ванадат – молибдатным реактивом***

#### Принцип метода.

Фосфор в безбелковом фильтрате образует с ванадат -молибдатным реактивом лимонно-желтое окрашивание, интенсивность которого пропорциональна содержанию фосфора в крови (сыворотке крови).

#### Реактивы.

1. Диагностический набор фирмы «Лахема» - «Фосфор».
2. Эталонный-стандартный раствор фосфора 5 мМ/л 0,68 г  $\text{KN}_2\text{P}_4$  перекристаллизованного и высушенного до постоянного веса растворяют в 1 л воды. Перед применением разводят водой в 2 раза (2,5 мМ/л).
3. 10% раствор трихлоруксусной кислоты. 100 г ТХУ растворяют в 900 мл воды.
4. 2 мМ/л раствор ванадата аммония. 0,234 г ванадата аммония растворяют в 500 мл воды (кипящей) и кипятят до пожелтения раствора, охлаждают, доводят до 1 литра.
5. 30 мМ/л раствор молибдата аммония. 5,88 г молибдата аммония растворяют в 500 мл воды при температуре = 50°C, после охлаждения добавляют 100 мл концентрированной серной кислоты, охлаждают, доводят водой до 1 литра.
6. Ванадат-молибдатный реактив. Перед проведением исследования смешивают растворы молибдата и ванадата аммония в равных объемах.
7. Кислота серная концентрированная, квалификации х.ч.

#### Количество необходимых реактивов на 100 анализов.

10% раствор ТХУ - 150 мл

Стандартный раствор фосфора – 5 мл

Раствор молибдата аммония – 100 мл

Ванадат-молибдатный реактив – 200 мл

#### Специальное оборудование.

1. Спектрофотометр.
2. Центрифуга.

3. Холодильник бытовой.
4. Пипетки на 200, 250, 500, 12000 мкл и наконечники к ним.
5. Колбы мерные на 1000 мл.
6. Пробирки Флоринского.
7. Пробирки центрифужные.
8. Штатив для пробирок.
9. Весы аналитические.
10. Флаконы на 500, 1000 мл.
11. Мерные цилиндры на 25 и 50 мл.
12. Секундомер.

Материал для исследования.

Материалом для исследования служит кровь и сыворотка крови, свободная от гемолиза Таблица 11 и Таблица 12.

Таблица 11 - Ход определения.

№ п /п	Реактивы в мл (депротеинирование)	Проба	Стандарт	Контроль
1	Кровь (сыворотка)	0,2	-	-
2	Стандарт	-	0,2	-
3	Вода	-	-	0,2
4	10% раствор ТХУ	0,2	1,0	1,0

Перемешивают и через 5 минут центрифугируют при 3000 об./мин в течение 10 минут.

Таблица 12 - Постановка реакции.

Реактивы в мл	Проба	Стандарт	Контроль
Супернатант	0,5	0,5	0,5
Ванадат-молибдатный реактив	0,5	0,5	0,5

Перемешивают и через 2 часа измеряют оптическую плотность пробы и стандарт против контроля на спектрофотометре с проточной микрокюветой при 436 нм.

Расчет результатов по формуле (31).

$$\text{Соп.} = \frac{\text{Еоп.} \times 2,5}{\text{Ест.}} \text{ (мМ/л)}, \quad (31)$$

где Соп. - концентрация неорганического фосфора в крови, сыворотке крови;

Еоп. - экстинция опытной пробы;

Ест. - экстинция стандартной пробы.



**Кальций** является одним из наиболее важным химическим элементом, необходимым для обеспечения основных жизненных процессов как животных так и птицы (Г.М. Мишин, 1968). Он усиливает биосинтез липидов в печени (М.Ф. Нестерин, 1965). При введении кальция в воротный кровоток повышается активность щелочной фосфатазы в печени, резко возрастает активность АТФ-азы. Это свидетельствует о том, что кальций активизирует тканевые фосфатазы, которые в свою очередь усиливают функции печени и выделение желчных кислот, липидных компонентов (В.Д. Романенко, 1975). В крови циркулирует в трех формах: 45-50% находится в ионизированном состоянии, 40-45% связано с белками, остальное количество образует комплексы с различными низкомолекулярными анионами. Физиологически активен ионизированный кальций. Уровень общего кальция в крови определяется суммой ионизированного связанного с белками крови и различными анионами кальция. Концентрация кальция в сыворотке крови – величина довольно постоянная. Однако его содержание может изменяться в зависимости от уровня поступления его с кормами и клинического состояния организма животных и птиц. Снижение содержания кальция в крови (гипокальциемия) наблюдается при длительном дефиците его в рационе или при плохом усвоении при недостатке витамина Д, протеина, углеводов, избытке фосфора и цинка.

Повышение содержания кальция в крови (гиперкальциемия) бывает редко и может быть при избытке йода в организме, острой костной дистрофии, гипервитаминозе Д.

***Определение кальция в сыворотке крови комплексометрическим методом по Уилкинсону***

Принцип метода.

Мурексид при рН 10 - 13 образует с кальцием соединение розового цвета. При добавлении трилона Б, последний образует с кальцием более прочное комплексное соединение и мурексид освобождается с восстановлением точки эквивалентности первоначального фиолетового цвета.

Реактивы.

1. 0,005 н раствор динатриевой соли ЭДТА (трилон Б). 0,932 г вещества растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе на 1 л и доводят до метки, добавляют несколько капель хлороформа или толуола. 1 мл такого раствора ЭДТА эквивалентен 0,1 мг кальция.

2. 1,8 н раствора едкого натра. 7,2 г вещества растворяют в дистиллированной воде, после охлаждения объём доводят до 100 мл.

3. Водный раствор индикатора мурексида (пурпурат аммония) содержащий в 1 мл 1 мг вещества. Готовят в день проведения анализов. Хранят в холодильнике не более 3 суток.

4. Стандартный раствор углекислого кальция. 2,495 г предварительно высушенного до постоянного веса при температуре 105-110° С углекислого кальция, помещают в колбочку на 150-200 мл, добавляют 20-25 мл воды и концентрированной соляной кислоты каплями до полного

растворения вещества. Затем смесь нагревают до кипения, переносят в мерную колбу на 1 мл и после охлаждения доводят дистиллированной водой до метки. 1 л содержит 1 мг кальция.

5. Установление титра ЭДТА. 1 мл 0,005 н раствора ЭДТА эквивалентен 0,1 мг кальция, содержащемуся в 0,1 мл стандартного раствора углекислого кальция. Берут 0,1 мл стандартного раствора кальция, добавляют 9,3 мл бидистиллированной воды, 0,4 мл 1,8 н раствора едкого натра, 2 капли раствора индикатора мурексида и титруют до перехода розовой окраски в фиолетовую (окраска контроля). Проводят не менее 6 параллельных определений и вычисляют среднюю величину раствора ЭДТА. Титр ЭДТА равен единице, деленной на количество мл 0,005 н раствора ЭДТА, пошедшее на титрование 0,1 мл стандартного раствора углекислого кальция.

#### Количество необходимых реактивов на 100 анализов.

1. Этилендиаминтетрауксусная кислота динатриевая соль (трилон Б, хелатон), ч.д.а. - 0,1 г.
2. Натр едкий - 3,2 г.
3. Мурексид, ч.д.а. - 0,1 г.
4. Кальций углекислый, безводный, х.ч. - 0,25 г.

#### Специальное оборудование и аппаратура.

1. Стаканчики химические.
2. Пипетки на 0,1, 1,0 и 2,0 мл.
3. Колбы мерные на 100, 200 и 1000 мл.
4. Колбы конические из термостойкого стекла на 150-200 мл.
5. Электроплитка.
6. Микробюретки на 2,0 и 1,0 мл.

#### Материал для исследования.

Материалом служит сыворотка крови.

#### Ход определения.

1. В контрольный стаканчик вносят 9,4 мл бидистиллированной воды, 0,4 мл 1,8 н раствора едкого натра и 2 капли индикатора. Раствор окрашивается в фиолетовый цвет.

2. В опытный стаканчик вносят 9 мл воды, 0,4 мл 1,8 н раствора едкого натра, 0,4 мл сыворотки, 2 капли индикатора. Появляется светло-розовая окраска.

3. Опытную пробу ставят рядом с контролем и титруют по каплям 0,005 н раствором ЭДТА до восстановления цвета индикатора (окраска контроля).

4. Индикатор вносят в опытные образцы и стандарт непосредственно перед титрованием. Через 5-6 определений ставят новый контроль.

#### Расчет результатов.

Расчет проводится по формуле (32):

$$Ca, \text{мг}\% = p * T * 25 \quad (32)$$

Где  $p$  - количество мл раствора ЭДТА, пошедшее на титрование пробы;  
 $T$  - титр раствора ЭДТА; 25 - постоянный коэффициент.

### **Неорганические электролиты $K^+$ , $Na^+$ и $Ca^{++}$**

Они поддерживают в организме нормальный водный баланс. Как активные основания, входят в состав карбонатной, фосфатной, гемоглобиновой, оксигемоглобиновой, белковой и других буферных систем, чем определяют активную реакцию крови и тканей.

Исключительно важная роль калия и натрия в течении электрофизиологических процессов в клетке обусловлена их неравномерным распределением. Калий преобладает в клетке, натрий – в окружающей среде. На переход калия и натрия через клеточную мембрану регулирующее влияние оказывают ионы кальция. Повышение в окружающей среде ионов кальция снижает пропускную способность клеточной мембраны для натрия, а уменьшение ионов кальция – увеличивает вход натрия и выход калия. Такая асимметрия электролитов является обязательной предпосылкой нормального функционирования нервной и мышечной тканей.

Сравнительное описание различных методов количественного определения электролитов показало, что наиболее пригодными для этих целей является метод пламенной фотометрии.

**Принцип метода.** Исследуемая жидкость (цельная кровь, плазма, эритроциты или другие соответствующим образом подготовленные ткани) разбавляются дистиллированной водой до соответствующих концентраций стандартных растворов, засасывается в распылитель при помощи идущей под давлением струи сжатого воздуха и превращается в аэрозоль. В распыленном виде материал поступает в смеситель, где происходит обогащение горючим газом, а оттуда дальше в горелку. Специальной линзой весь пучок пламени направляется на интерференционный светофильтр, который выделяет из пламени необходимую длину волны, а именно: для  $K$  - 766 - 769 нм,  $Na$  – 588-599 нм и  $Ca$  630 нм. Выделенный светофильтром пучок света попадает на фотоэлемент, возбуждая в нем фототок, количество которого измеряется высокочувствительным гальванометром. Величина показаний гальванометра прямо пропорциональна концентрации элемента в испытуемом материале. Расчет количества электролитов проводится сравнением показаний гальванометра при фотометрии стандартных растворов с показаниями исследуемой пробы.

***Определение количества электролитов методом пламенной фотометрии (прямое измерение) в модификации Н. Е. Емельянова (1964), для крови птиц по Н. Д. Придыбайло (1971).***

Так как натрий является преобладающим элементом в плазме крови и значительно завывает показания по калию, а калий в эритроцитах – по натрию, то берутся их соотношения в стандартных растворах 1:20, что реально отображает их соотношение в плазме и эритроцитах. Эта методика

избавляет исследователя от необходимости иметь большое количество стандартных растворов при исследовании различных физиологических состояний у птицы.

В практике биохимических исследований у птиц определяют общее количество кальция, хотя наиболее активной формой в организме является ионизированная фракция. Прямое фотометрирование исследуемых растворов плазмы и цельной крови птиц позволяет определить уровень этой фракции кальция.

Реактивы:

- соли KCl и NaCl класса ЧДА,
- CaCl<sub>2</sub> - ГОСТ 4460-48, содержащий 93% чистого вещества.

Подготовка стандартных растворов в дистиллированной воде: для Na и K готовят в концентрации 0,5; 1,0; 1,5 и 2,0 мг %, а для Ca – 0,250; 0,375 и 0,500 мг %.

Приборы и оборудование: используют пламенный фотометр любой марки, но лучше фирмы «Карл Цейс», баллоны со сжатым воздухом и ацетиленом, либо природным газом, пропаном или бутаном. Предпочтение следует отдать ацетилену, при сгорании которого температура достигает 2345<sup>0</sup> С, в то время как для других газов она составляет 1925<sup>0</sup> С.

Ход определения. Первоначально фотометрируют трехкратно стандартные растворы калия и натрия. Затем в растворы калия добавляют натрий в возрастающих соотношениях – 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 и 30 и наоборот – к натрию добавляют калий в тех же соотношениях. Затем фотометрируют растворы с преобладанием одного из электролитов трехкратно, выводят средний показатель и вычитают процент завышения побочным электролитом. Поскольку в живом организме нет такой ткани, где бы присутствовал только один из указанных электролитов, то за исходную величину берут соотношение 1:1, а не чистый раствор электролита.

Концентрацию преобладающего электролита (калия в эритроцитах, натрия в плазме) вычисляют без поправок. В цельной крови калий и натрий находятся примерно в соотношении 1:2, что также не требует поправок.

$$X = M \times 300 \quad (33)$$

где M – показатель электролита по стандартной шкале; 300 – кратность разведения плазмы крови и эритроцитов в пробе;

Подобно этому вычисляют и количество кальция в плазме крови.

$$X = M \times 25 \quad (34)$$

где M – показатель электролита по стандартной шкале; 25 – кратность разведения плазмы крови в пробе.

Калий в плазме вычисляют с учетом поправки на завышение натрием. Количество натрия в плазме уже определено ранее, а количество калия узнаем по формуле (35):

Например, получен результат содержания в плазме крови Na - 340 мг % и K - 20 мг % их соотношение в пробе будет равно 17:1. При этом показание K будет завышено на 24%, что равно 4,8 мг %. За вычетом 4,8 мг % из общего количества 20 мг %, окончательный результат по K в плазме будет равен 15,2%.

Контрольные вопросы:

1. Где синтезируется мочевины?
2. При помощи чего(какого способа) можно определить мочевины в сыворотке крови?
3. В чем заключается принцип метода определения креатинина в сыворотке крови по цветной реакции Яффе (по методу Лоппера)?
4. При помощи каких методов определяют активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови?
5. Увеличивается ли с возрастом концентрация холестерина в организме?
6. Где образуется билирубин?
7. Чем регулируется уровень глюкозы в крови?
8. Как называется заболевание, характеризующееся снижением глюкозы в крови?
9. Чем сопровождается дефицит витамина D в организме птицы?
10. На чем основан метод определения лимонной кислоты в сыворотке крови?

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

**Таблица А 1 - Некоторые показатели крови курицы**

Показатели	Ед. измер.	Колебания	Среднее	Автор
<b>Гематологические показатели крови птиц</b>				
эритроциты	10 <sup>12</sup> /л	3,0-4,0	3,5	Кондрахин Ч.П.,1985
лейкоциты	10 <sup>9</sup> /л	20,0-40,0	30	Кондрахин Ч.П.,1985
тромбоциты	тыс	32-100	75	Кудрявцев А.А 1973
гемоглобин	г/л	80-120	100	Кудрявцев А.А1973
цветной показатель	--	2-4	2,5	Кудрявцев А.А 1973
гематокрит	%	38-42	40	Кудрявцев А.А 1973
<b>Лейкограмма</b>				
<i>базофилы</i>	%	1-3	2	Кудрявцев А.А 1973
<i>эозинофилы</i>	%	6-10	8	Кудрявцев А.А1973
<i>псевдоэозинофилы</i>	%	24-30	27	Кудрявцев А.А 1973
<i>лимфоциты</i>	%	52-60	56	Кудрявцев А.А 1973
<i>моноциты</i>	%	4-10	7	Кудрявцев А.А 1973
<b>Скорость оседания эритроцитов</b>				
<i>15 мин</i>	мм	0-1	0,5	Кудрявцев А.А1973
<i>30 мин</i>	мм	1,0-3,0	2	Кудрявцев А.А 1973
<i>45 мин</i>	мм	2,5-4,0	3,5	Кудрявцев А.А1973
<i>60 мин</i>	мм	4,0-6,5	5	Кудрявцев А.А 1973

## ПРИЛОЖЕНИЕ Б

**Таблица Б. 1 – Физико-химические показатели крови птиц**

Физические и биохимические показатели крови птиц				
<i>Общее кол-во крови:</i>				
<i>к весу тела</i>	%	6-7	6,5	Кудрявцев А.А 1973
<i>кол-во крови на кг/веса тела</i>	мл	78-90	85,0	Кудрявцев А.А 1973
удельный вес крови	—	1,050-1,058	1,054	Кудрявцев А.А 1973
вязкость крови	—	4,5-5,5	5	Кудрявцев А.А 1973
осмотическое давление крови	—	0,610-0,620	0,615	Кудрявцев А.А 1973
рН крови	—	7,4- 7,44	7,42	Кудрявцев А.А 1973
резервная щелочность плазмы крови	об.%CO <sub>2</sub>	48-52	50	Кудрявцев А.А 1973
плотность крови	—	—	1,044	Рихтер В. ВернерЭ. 1982
объем крови к массе тела курица	%	6,0-9,0	7,0	Рихтер В. Вернер Э. 1982
объем крови к массе тела петух	%	9,2-10,0	9,5	Рихтер В. Вернер Э. 1982

## ПРИЛОЖЕНИЕ В

**Таблица В. 1 – Насыщенность эритроцитов**

<i>Насыщенность эритроцитов:</i>				
<i>гемоглобином</i>	1:10 <sup>-12</sup>	36-40	38	Кудрявцев А.А 1973
объем эритроцита	мк <sup>3</sup>	--	127	Кудрявцев А.А 1973
поверхность эритроцита	мк <sup>2</sup>	--	182	Кудрявцев А.А 1973
толщина эритроцита	мк	--	2,7	Кудрявцев А.А 1973
длительность жизни эритроцитов	дни	25-30	28	Кудрявцев А.А 1973
размер эритроцита	мк	--	6,5	Кудрявцев А.А 1973
свертываемость крови	мин	3-5	4	Кудрявцев А.А 1973
фибриноген в плазме	мг%	600-700	650	Кудрявцев А.А 1973
белок общий в сыворотке	г/л	43-59	48	Кудрявцев А.А 1973
<i>Белковые фракции сыворотки крови, %</i>				
<i>альбумины</i>	%	31,4-35,1	33,2	Кудрявцев А.А 1973
<i>альфа-глобулины</i>	%	17,3-19,2	18,5	Кудрявцев А.А 1973
<i>бета-глобулины</i>	%	10,9-12,8	12	Кудрявцев А.А 1973
<i>гамма-глобулины</i>	%	35,1-37,1	36,3	Кудрявцев А.А 1973
сахар истинный в крови	мг%	80-140	120	Кудрявцев А.А 1973
сахар общий в крови	мг%	120-200	180	Кудрявцев А.А 1973
молочная кислота в крови	мг%	18-24	21	Кудрявцев А.А 1973
кальций в крови	ммоль/л	2,5-4,5	3,5	Кудрявцев А.А 1973
кальций в сыворотке	ммоль/л	3,5 – 5,5	4,5	Кудрявцев А.А 1973
фосфор общий в крови	мг%	50-90	60	Кудрявцев А.А 1973
фосфор общий в сыворотке	мг%	25-46	33	Кудрявцев А.А 1973
фосфор неорганический в крови	мг%	4-6	5	Кудрявцев А.А 1973



фосфор неорганический в сыворотке	мг%	3,8-5,6	4,2	Кудрявцев А.А 1973
билирубин общий	мкмоль/л	--	1,7	Кудрявцев А.А 1973
билирубин прямой	мкмоль/л	--	0,5	Кудрявцев А.А 1973
липиды общие в сыворотке	г/л	5-20	12,5	Кондрахин И.П. 1985
магний в крови	мг%	3,5-5,5	4,5	Кудрявцев А.А 1973
магний в сыворотке	мг%	2,0-2,7	2,3	Кудрявцев А.А 1973
калии в крови	мг%	180-200	190	Кудрявцев А.А 1973
калий в сыворотке	мг%	19-25	18	Кудрявцев А.А 1973
натрии в крови	мг%	230-260	245	Кудрявцев А.А 1973
натрий в сыворотке	мг%	350-400	375	Кудрявцев А.А 1973
железо в крови	мг%	30-34	32	Кудрявцев А.А 1973
железо в сыворотке	мкг%	160-200	180	Кудрявцев А.А 1973
общий азот в сыворотке	мг%	1800-2200	2000	Тетерина А.В., 1956
остаточный азот в крови	мг%	95	80-110	Тетерина А.В., 1956
хлор в крови	мг%	330-380	360	Кудрявцев А.А 1973
хлор в сыворотке	мг%	450-490	470	Кудрявцев А.А 1973
цинк в цельной крови	мг%	0,6-0,8	0,7	Георгиевский В.И., 1970
цинк в плазме	мг%	0,15-0,25	0,2	Георгиевский В.И., 1970
марганец в крови	мг%	0,01-0,03	0,02	Георгиевский В.И., 1970
йод в крови	мг%	--	0,007	Георгиевский В.И., 1970
селен в крови	мкг%	50-70	60	Кудрявцев А.А., 1969
медь в крови	мкг/ %	50-70	60	Кондрахин И.П., 1985

## ПРИЛОЖЕНИЕ Г

**Таблица Г. 1 - Гематологические показатели цыплят-бройлеров в зависимости от возраста, N=300 ( по Верещак Н.А., 2005 г.)**

Показатели	Суточные	7 дней	14 дней	22 дня	42 дня
Эритроциты, $10^{12}$	1,86	2,84	2,85	3,45	2,81
Гемоглобин, г/л	85,4	83,64	80,7	86,2	86,4
Лейкоциты, $10^9$	30,5	41,16	30,8	22,6	29,42
Псевдоэозинофилы, %	22,2	20,0	19,4	24,0	26,0
Эозинофилы, %	3,0	3,6	3,6	4,2	3,2
Моноциты, %	2,8	3,6	4,2	3,07	4,22
Базофилы, %	0,3	0,56	0,4	0,6	0,47
Лимфоциты, %	71,4	72,8	72,6	64,0	70,06

**Таблица Г. 2 - Иммунологические показатели кур маточного поголовья, N=300 (по Верещак Н.А., 2005 г.)**

Показатели	Возраст, дней			
	182	284	304	328
Эритроциты, $10^{12}$	2,7	1,9	2,54	2,7
Гемоглобин, г/л	103,7	86,8	81,7	111,6
Лейкоциты, $10^9$	37,5	31,1	27,2	40,5
Т-лимфоциты, %	12,8	16,8	13,2	13,6
В-лимфоциты, %	17,6	18,8	16,8	16,4
Индекс Т/В	0,76	0,9	0,8	0,86
Фагоцитарная активность, %	14,2	17,2	14,4	13,2
Фагоцитарный индекс, у.е.	3,2	5,6	3,6	2,63

## ПРИЛОЖЕНИЕ Д

**Таблица Д. 1 - Гематологические показатели цыплят кроссов «Родонит» и «Смена 2» 1,7, 15, 30, 60 дней жизни, N = 300 (по Кондратьеву Р.Б., 2006 г.)**

Показатели	Кросс Родонит (возраст, дней)					Смена 2 (возраст, дней)				
	1	7	15	30	60	1	7	15	30	60
Эритроциты, $10^{12}/л$	2,3	2,8	3,0	2,5	2,7	1,6	2,1	3,3	2,8	3,4
Гематокрит, %	31,3	32,8	34,3	32,6	33,8	25,3	29,4	38,2	35,5	36,8
Средний объем	139,3	119,5	118,5	135,3	127,6	161,3	141,6	119,2	128,8	123,1
Гемоглобин г/л	98	114	157	124	138	85	97	145	127	135
ЦП	1,3	1,4	1,7	1,5	1,6	1,7	1,4	1,3	1,5	1,4

**Таблица Г. 2 - Гемоглобиновый профиль цыплят кроссов «Родонит» и «Смена 2» 1,7, 15, 30, 60 дней жизни, % N = 300 (по Кондратьеву Р.Б., Садовникову Н.В., 2006 г.)**

Фракция	п/фр	Кросс «Родонит»					Кросс «Смена 2»				
		Возраст, дней					Возраст, дней				
		1	7	15	30	60	1	7	15	30	60
Нб D	--	33,26	36,17	37,54	33,46	35,24	37,9	36,22	34,6	32,1	30,14
Нб А		66,74	63,83	62,46	66,54	64,76	62,1	63,79	65,4	67,9	69,96
	1-я	--	--	28,29	--	38,08	--	--	45,28	35,4	27,28
	2-я	--	--	34,17	--	26,68	--	--	20,12	32,5	42,67

## ПРИЛОЖЕНИЕ Е

**Таблица Е. 1 - Лейкоцитарная формула крови в зависимости от возраста и времени года ( по Задарновской А.К., 1968 г)**

	Возраст, сутки	Время года	Нейтрофилы	Лимфоциты	Псевдоэозинофилы		Лейкоциты	Моноциты
					П/Я	С/Я		
Цыплята	1-2	Лето	3,4	2,4	4,7	58,6	31,9	2,5
	5		3,0	2,7	5,4	62,3	28,9	1,5
	7		3,5	3,6	2,3	48,8	40,1	3,3
	8		3,6	3,7	2,3	33,9	54,9	3,4
	9		2,2	2,5	2,5	23,8	66,5	1,0
	10		1,3	2,1	0,5	27,3	66,4	6,5
	15		3,0	3,3	1,3	26,4	64,7	1,3
	19		3,0	4,7	1,3	30,3	57,8	2,9
	22		2,0	3,5	1,5	27,8	63,0	2,2
	25		3,0	3,7	1,2	26,8	62,0	3,3
Петушки	75-90		3,1	2,5	0,3	22,3	68,6	3,2
Курицы	75-90		2,6	3,5	---	18,9	72,5	2,5
Курицы	Взрослые	Весна	3,3	2,6	1,1	28,2	60,0	4,8
		Лето	6,9	1,0	0,9	28,2	59,3	3,7
		Зима	2,6	2,1	1,4	22,3	66,2	5,4
Петухи	Взрослые	Весна	2,1	3,4	1,9	42,5	43,4	6,7
		Лето	6,0	0,4	1,0	28,3	57,3	7,0
		Зима	1,2	2,9	2,2	32,1	56,2	5,4

## ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

Таблица Ж. 1 - Показатели перекисного окисления липидов периферической крови клинически здоровых кур зрелого (5-6 месяцев) и старого (19 -20 месяцев) возраста, N = 300 (по Бубенщикову О.М., 2003 г.)

Показатели	Зрелые	Старые
Светосумма ХЛ сыворотки крови, отн. ед./г липидов	1660	1318
Амплитуда ХЛ сыворотки крови, отн. ед/г липидов	127	192
Диеновые конъюгаты сыворотки крови, мкмоль/г гемоглобина	0,257	0,202
Гидроперекиси, ммоль/л	8,77	7,62
Фосфолипаза у.е./ г гемоглобина	0,14	0,11
Активность каталазы у.е./ г гемоглобина	0,785	0,509
Активность СОД, у.е. /г гемоглобина	254	280
Активность пероксидазы, у.е. /г гемоглобина	28	20

**ПРИЛОЖЕНИЕ 3**

**Таблица 3. 1 - Показатели крови птиц разных видов (по Кудрявцеву А.А., 1973 г)**

Показатели	Ед. измер.	Цесарка		Индейка		Гусь		Утка		Голубь		Перепелка	
		Колеб-я	Среднее	Колеб-я	Среднее	Колеб-я	Среднее	Колеб-я	Среднее	Колеб-я	Среднее	Колеб-я	Среднее
Вода в крови	%	--	80,0	--	79,8	--	80,0	--	80,0	--	79,5	--	79,5
Вода в сыворотке	%	--	93,0	--	94,0	--	93,0	--	94,0	--	93,0	--	93,0
Эритроциты	10 <sup>12</sup> /л	3,0-4,2	3,6	2,5-3,5	3,0	2,5-3,5	3,0	3,0-4,5	3,8	3,0-4,0	3,5	3,2-4,4	3,8
Гемоглобин	г/л	80-120	100	70-110	100	90-135	105	100-125	115	100-170	130	128-157	143
<i><b>Насыщенность ритроцитов</b></i>													
<i><b>Гемоглобином</b></i>	1:10 <sup>-12</sup>	--	40,0	--	42,0	--	45,0	--	42,0	--	40,0	--	43,0
Размер эритроцита	Мк	--	--	13,0-14,4*6,8-7,2	13,9*7,0	11,7-13,2*6,3-6,7	12,8*6,5	11,9-13,8*6,5-6,7	13,0*6,6	11,8-14,3*5,7-7,1	13,3*6,4	--	--
Объем эритроцита	мк <sup>3</sup>	--	136,0	--	142,0	--	146,0	--	152	--	149	--	124,0
Гематокрит	%	--	42	--	43,0	--	44,0	--	39,5	--	58,5	--	46,9
Свертываемость Крови	мин	--	--	4,3-7,0	5,8	3,6-6,0	4,8	3,0-5,3	4,3	3,5-7,2	5,2	3,2-4,5	3,8
Общее количество крови к весу тела		--	9,5	--	10,3	--	12,0	--	11,4	--	10,2	--	--
Тромбоциты	10 <sup>9</sup> /л	50,0-90,0	70,0	30,0-70,0	55,0	35,0-80,0	60,0	35,0-80,0	60,0	10,0-35,0	20,0	--	130
Лейкоциты	10 <sup>9</sup> /л	20,0-40,0	30,0	20,0-40,0	30,0	20,0-30,0	25,0	20,0-40,0	30,0	10,0-30,0	20,0	16,0-29,9	23,1
<i><b>Лейкоцитарная формула, %</b></i>													
<i><b>Базофилы</b></i>	%	0-3,0	2,0	0-3,0	2,0	1,0-3,0	2,0	0-5,0	2,0	1,0-5,0	3,0	0-0,4	0,2
<i><b>Эозинофилы</b></i>	%	6,0-10,0	8,0	0-3,0	1,0	3,0-9,0	7,0	4,0-12,0	8,0	2,0-8,0	5,0	3,5-5,1	4,3
<i><b>Псевдоэозинофилы</b></i>	%	30,0-42,0	36,0	30,0-42,0	37,0	30,0-44,0	38,0	30,0-42,0	36,0	28,0-54,0	41,0	18,1-24,6	21,8
<i><b>Лимфоциты</b></i>	%	45,0-55,0	50,0	49,0-60,0	54,0	40,0-56,0	49,0	42,0-59,0	49,0	38,0-54,0	48,0	65,0-94,6	71,6
<i><b>Моноциты</b></i>	%	2,0-6,0	4,0	4,0-8,0	6,0	2,0-6,0	4,0	2,0-7,0	5,0	1,0-5,0	3,0	1,8-2,5	2,1

## ПРИЛОЖЕНИЕ И

**Таблица И. 1 - Возрастная динамика эритроцитов, гемоглобина цветового показателя и пролиферативного пула клеток в крови у цыплят (по Садовникову Н.В., 1995 г.)**

Возраст Цыплят	Показатели				
	Эритроциты $10^{12}/л$	Лейкоциты $10^9/л$	Гемоглобин г/л	Цветной показатель	Величина пролиферативного пула
5	1,5	16,5	104	1,3	30,4
15	1,5	21,5	120	1,5	5,9
30	2,1	26,6	110	1,6	2,9
60	2,0	30,2	130	1,7	2,6
90	2,3	28,8	160	1,5	2,2

**Таблица И. 2 - Возрастная динамика содержания общего белка и белковых фракций в сыворотке крови у здоровых цыплят (по Садовникову Н.В., 1995 г.)**

Возраст Цыплят (СУТОК)	Показатели					
	Общий белок г/л	Альбумин %	$\alpha_1$ -глобулины %	$\alpha_2$ -глобулины %	$\beta$ -глобулины %	$\gamma$ -глобулины %
7-8	25,5	36,3	3,6	9,9	24,7	30,9
15	28,5	32,1	6,0	15,4	13,6	13,2
30	34,6	38,6	8,2	15,6	14,7	20,4
60	39,5	44,5	10,4	13,6	15,5	20,6
90	40,8	36,2	9,7	12,8	16,3	20,1

### ПРИЛОЖЕНИЕ К

**Таблица К.1 - Возрастная динамика содержания креатинина, аспаратаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), глюкозы, массовой концентрации холестерина (ХС) и триглицеридов (ТГ), общего билирубина в сыворотки крови здоровых цыплят (по Садовникову Н.В., 1995 г.)**

Возраст цыплят	Показатели							
	СУТОК	Креати- нин мкмоль/л	АСТ ммоль/л*	АЛТ ммоль/л*	ЩФ ед. Бода- нского	Глюкоза ммоль/л	Холестери н ммоль/л	Хс+ТГ г/л
7- 8	21,6	2,1	0,11	3,7	13,7	4,3	1,11	1,6
15	20,4	2,3	0,05	3,5	14,2	3,7	0,99	1,8
30	14,0	2,7	0,07	5,3	11,1	2,8	0,96	2,7
60	13,9	1,5	0,13	4,9	12,3	2,6	1,2	2,9
90	12,5	3,5	0,09	5,2	10,9	2,5	1,4	3,8



### ПРИЛОЖЕНИЕ Л

**Таблица Л.1 – Показатели перекисного окисления липидов и системы антиоксидантной защиты в крови клинически здоровых кур (по Бузлама В.С., Рецкому М.И., Мещерякову Н.П., 1997 г.)**

Показатели	Курица	
Диеновые конъюгаты, ед. опт. пл. /мг липидов	0,200-0,300	
Кетоднены, ед. опт. пл./мг липидов	0,100-0,150	
Малоновый диальдегнд, мкМ/л крови	1,50 – 2,5	
Флуоресцирующие основания Шиффа, отн. ед. /мл сыворотки	0,30	- 0,60
Восстановленный глутатнон, мМ/л	0,6	- 0,8
Витамин Е, мкМ/л	10	- 25
Церулоплазмин, мкМ бензохиона/ л* мин	50 - 120	
Активность СОД, ед. акт. /мг гемоглобина	1,5	- 3,5
Активность каталазы, мкМ Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub> /л* мин * 10 <sup>3</sup>	40	- 60
Активность пероксидазы, ед. опт. пл. /л * сек	30	- 40
Активность глутатионпероксидазы, мкМ восстановленного глутатиона/л * мин * 10 <sup>3</sup>	10	- 15
Активность глутатионредуктазы, мкМ окисленного глутатиона /л* мин	200	- 300
Антиокислительная активность плазмы, л* мл <sup>-1</sup> * мин <sup>-1</sup> * 10 <sup>3</sup>	0,2-0,5	

**Таблица Л.2 – Некоторые иммунологические показатели крови цыплят-бройлеров, N=300 (по Топурия Г.М., 2008 г.)**

Возраст Цыплят (СУТОК)	Показатели						
	Лизоцим, %	Бета-лизины, %	Бактерицидная активность сыворотки, %	Фагоцитарная активность лейкоцитов, %	Иммуноглобулины, г/л		
					IgA	IgG	IgM
1	55,4	53,6	54,6	48,6	—	1,9	0,2
7	35,4	59,6	62,8	53,0	—	2,6	1,1
14	38,6	61,0	65,2	56,8	—	2,9	1,08
28	43,8	62,4	70,0	61,4	—	3,4	1,32
42	47,6	65,2	74,6	67,0	2,4	4,5	1,34

## ПРИЛОЖЕНИЕ М

**Таблица М.1 - Миелограмма костного мозга цыплят в зависимости от возраста (по Малахеевой Л.И., Садовникову Н.В., 2002 г.)**

Показатели, %	Возраст, суток								
	1	7	14	21	40	60	90	125	185
Миелобласт	0,68	0,47	0,8	1,25	0,94	0,73	0,3	0,3	1,0
Промиелобласт	1,19	1,09	2,67	1,88	3,15	1,53	0,79	1,0	2,47
Миелоцит псевдоэозиноф.	1,69	1,47	4,53	3,76	11,8 6	4,17	2,08	1,1	4,2
Миелоцит эозин.	0	0,27	0,4	0,35	0,33	0,13	0	0,1	0,4
Миелоцит базоф.	0	0,07	0,2	0,14	0,4	0,2	0	0	0,2
Метамиелоцит псевдоэозиноф.	3,37	7,01	10,0	6,57	12,1 7	6,35	6,94	2,5	6,8
Метамиелоцит эозин.	0,17	0,33	0,33	0,28	0,13	0,6	0,2	0,2	0,53
Метамиелоцит базоф.	0	0,13	0,2	0,21	0,2	0,46	0,1	0,1	0,2
Палочкоядерн. псевдоэозиноф.	5,73	13,27	10,8	10,0	7,7	15,1	11,59	2,7	5,93
Палочкоядерн. эозин.	0,17	0,27	0,33	0,27	0,13	0,33	0,4	0,2	0,27
Палочкоядерн. базоф.	0,17	0,24	0,13	0	0,13	0,27	0,1	0,2	0,13
Сегментоядер. псевдоэозиноф.	3,37	3,73	4,6	4,33	4,42	7,57	3,24	1,4	2,6
Сегментоядер. эозин.	0,34	0,13	0,2	0,14	0,2	0,27	0	0,1	0,2
Сегментоядер. базоф.	0	0,13	0	0,21	0,13	0,33	0	0	0,07
Лимфобласты	1,36	8,87	16,2	12,7	6,99	0,93	0,5	5,2	6,8
Пролимфоциты	1,19	16,11	2,33	4,27	3,66	2,52	1,01	7,1	8,13
Лимфоциты	6,41	3,73	2,27	2,21	2,74	5,43	3,96	17,0	12,93
Монобласты	0,34	1,47	1,0	1,09	1,0	0,33	0,4	2,8	1,8
Промоноциты	0,34	2,07	1,33	2,15	1,39	0,26	0,6	3,8	2,93
Моноциты	0,68	0,87	0,6	0,94	1,59	0,46	0,69	8,5	5,27
Эритробласты	1,02	0,4	0,87	1,75	0,47	1,06	0,81	0,7	1,4
Пронормоциты	2,38	1,12	2,13	3,47	1,39	2,97	2,42	2,5	2,73
Нормоциты базоф.	8,48	9,73	7,67	8,76	8,33	7,0	7,78	7,0	7,13
Нормоциты полихр.	14,59	11,13	13,67	12,72	13,1 4	10,49	15,95	8,7	10,0
Нормоциты оксифильн.	24,45	3,87	7,33	16,64	9,47	19,43	24,35	13,5	12,27
Ретикулоциты	21,9	12,41	9,4	3,91	7,93	11,09	15,8	13,3	3,6
Костно-мозговой индекс псевдоэозинофилов	1,03	0,58	1,14	1,03	2,23	0,58	0,71	1,1	1,95
Индекс созревания эритронормобластов	0,54	0,39	0,51	0,6	0,56	0,58	0,6	0,49	0,6
Лейкоэритробластическое Отношение	0,43	1,6	1,44	1,65	1,5	0,96	0,55	1,2	1,71

## ПРИЛОЖЕНИЕ Н

**Таблица Н.1 - Электролитный состав крови кур русской белой породы (мг/%) по Придыбайло Н. Д. (1971 г.)**

Электролиты	Возраст, мес	Исследуемый материал	Количество проб	Пределы колебаний	М +м -
К	6-18	Цельная кровь	50	108 - 189	144 ± 2,1
К	6-18	Эритроциты	59	333 - 435	391 ± 3,0
К	6-18	Плазма	60	9,4 - 19,7	15,4 + 0,3
Na	6-18	Цельная кровь	60	264 - 300	263 ± 1,9
Na	6-18	Эритроциты	59	20,2 - 65,8	38,0 + 1,5
Na	6-18	Плазма	60	291 - 403	341 ± 3,3
Ca	6-18	Плазма	42	6,5 - 13,8	9,9 ± 0,3
К	2	Эритроциты	10	378 - 414	392 ± 4,5
К	2	Плазма	10	12,6 - 22,8	19,8 + 0,3
Na	2	Эритроциты	10	1,7 - 35,5	23,8 + 2,2
Na	2	Плазма	10	296 - 387	337 + 11,0
Ca	2	Плазма	10	5,0-6,7	5,9 + 0,6
К	До 1	Эритроциты	29	324-450	394 + 5,3
К	До 1	Плазма	39	9,1 - 29,2	18,1 + 0,6
Na	До 1	Эритроциты	18	25,5-59,5	35,9 + 2,3
Na	До 1	Плазма	40	270-402	349 + 16,4
Ca	До 1	Плазма	15	5,7-8,0	69,2 + 0,3

## ПРИЛОЖЕНИЕ О

**Таблица О.1 - Количество розеткообразующих клеток у СПФ цыплят в онтогенезе (по Ездаковой И. Ю., Чуйко О. М., Чадиной Е. О., 2008 г.)**

Возраст, Сутки	Исследуемый материал	Розеткообразующие клетки	Количество, %
3	Периферическая кровь	Т-лимфоциты, (Е-РОК)	26,1
3	Периферическая кровь	Т-лимфоциты, (Етф-РОК)	23,0
3	Периферическая кровь	В-лимфоциты, (ЗС <sub>3</sub> -РОК)	16,5
9	Периферическая кровь	Т-лимфоциты, (Е-РОК)	9,0
9	Периферическая кровь	Т-лимфоциты, (Етф-РОК)	37,0
9	Периферическая кровь	В-лимфоциты, (ЗС <sub>3</sub> -РОК)	17,0
21	Периферическая кровь	Т-лимфоциты, (Е-РОК)	28,3
21	Периферическая кровь	Т-лимфоциты, (Етф-РОК)	7,0
21	Периферическая кровь	В-лимфоциты, (ЗС <sub>3</sub> -РОК)	47,0

## ЛИТЕРАТУРА

1. Аникеева С.П. К методике стабилизации свободных SH – групп восстановленного глутатиона./ Лабораторное дело. – 1972 . - № 9 – с. 571-572.
2. Алексеев Ф.Ф. Промышленное птицеводство. / Алексеев Ф.Ф., Асриян М.А., Бельченко Н.Б., М.-Агропромиздат, - 1991 .- 544 с.
3. Болотников И.А. Гематология птиц. / И.А. Болотников, Ю.В. Соловьев. - Л.:Наука, 1980.- 114 с.
4. Болотников И.А. Практическая иммунология с/х птицы. / И.А. Болотников, Ю.В. Конопатов. – Санкт-Петербург: Наука, - 1993.- 65с.
5. Бузлама В.С., Рецкий М.И., Мещеряков Н.П., Рогачев Т.Е. Методическое пособие по изучению процессов перекисного окисления липидов и системы антиоксидантной защиты организма животных. / Воронеж - 1997. - 36 с.
6. Бубенчиков О.М. Роль свободнорадикального окисления липидов в механизмах возрастной инволюции системы крови животных в условиях воздействия экстремальных факторов. / Диссертация ..... канд. биол. наук. – Екатеринбург – 2003. – 171 с.
7. Верещак Н.А. Оценка показателей иммунной системы и методы коррекции иммунной недостаточности у продуктивных животных и птицы в Уральском регионе. / Диссертация ..... доктора ветеринарных наук. – Екатеринбург – 2007. - 305 с.
8. Гладков Б.А. Некоторые физиологические и возрастные особенности иммунной системы у кур. / Диагностика, патоморфология. патогенез и профилактика болезней в промышленном животноводстве. - Саратов, 1990.- Ч.2.- с. 132-135.
9. Дубинина Е.Е., Сальникова Л.А. Активность и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов и плазмы крови. / Лабораторное дело. – 1983. - №10. – с. 30-32.
10. Ездакова И.Ю. Чуйко О.М, Чадина Е.О./ Динамика розеткообразующих клеток кур в онтогенезе// Ветеринарная патология.- 2008, №2.- с. 62-64.
11. Кисилевич Р. Ш., Скварко С.И. Об определении витамина Е в крови./ Лабораторное дело. – 1972. - № 8 – с. 473-475.
12. Колбаская Л. С., Попова В. Д., Маккаевская Е.А., Колупаева Е.Д. Рекомендации по определению показателей естественной резистентности крови птиц. / С-Петербург - 1980. – 34 с.
13. Кондратьев Р.Б. Исследование качественных изменений красной крови цыплят раннего постнатального периода онтогенеза в условиях нормального и измененного гемопоэза./ Диссертация ..... канд. биол. наук. – Екатеринбург – 2007. – 200с.
14. Кондрахин И.П. с соавт. Клиническая лабораторная диагностика в ветеринарии./ Справочное издание. Москва. -1985. - 287 с.

15. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. Метод определения активности каталазы. / Лабораторное дело – 1988. - № 1 .- с 16 - 19.
16. Котомцев В.В. Клинико - биохимические показатели крови животных. / Методические пособие. - Екатеринбург. - 2006. -102 с.
17. Коляков Я.Е. Ветеринарная иммунология. / М.: Агропроиздат, - 1990.- 200 с.
18. Кочиш И.И., Петраш М.Г., Смирнов С.Б. Птицеводство. / Москва: Колос, - 2006. - 253 с.
19. Кругликов Г.О., Штутман И.М. Глутатинпероксидазная и глутатионредуктазная активность печени крыс после введения селенита натрия. / Украинский биохимический журнал. -1976. - № 2 - с. 223-227
20. Малахеева Л.И. Сравнительная характеристика клеточного состава органов иммуногенеза у птицы, инфицированной патогенными и вакцинными штаммами FC 126 и CVI 988/RISPENS при болезни Марека. / Диссертация ..... канд. биол. наук. – Екатеринбург – 2002. – 188 с.
21. Мелехин Г.П. Физиология сельскохозяйственной птицы / Г.П. Мелехин, Н.Я. Гридин. - М.:Колос, 1977.- 120 с.
22. Митюшников В. М. Естественная резистентность сельскохозяйственной птицы. М.: Россельхозиздат. 1985.-с. 160.
23. Плешков Б.П. Определение активности пероксидазы./ Практикум по биохимии растений. – М. – 1976. - с. 213-215.
24. Подобед Л. И. Руководство по кальций фосфорному питанию сельскохозяйственных животных и птиц/Монография.\_Одесса: «Печатный дом»,2008.- 408 с.
25. Придыбайло Н. Д. Определение электролитного состава крови кур методом пламенной фотометрии//Сб. научн. Тр.ВНИИБП, вып. 7(18).- Л.,1971.- с.426-428.
26. Рецкий М.И., Бузлама В.С., Шахов А.Г. Значение антиоксидатного статуса в адаптивной гетерогенности иммунологической резистентности животных./ Вет. патология № 2, 2003.-С.63-65
27. Садовников Н.В. Морфофункциональные изменения в иммунных органах у цыплят разной степени физиологической зрелости до и после воздействия регуляторными пептидами. / Диссертация.... доктора ветеринарных наук. – С-Петербург – 1995. – 303 с.
28. Самохин В.Т. Профилактика нарушений обмена микроэлементов у животных./Воронеж: Воронежский государственный университет, - 2003. - 136 с.
29. Семенов В.Л., Ярош А.М. Метод определения антиокислительной активности биологического материала. / Украинский биохимический журнал. - 1985. - № 3 - с. 50-52.
30. Смирнов В.А. Иммунодефицитные состояния / Под ред. В.А. Смирнова и И.С. Фрейдлина. – СПб: Фолиант, - 2000 – 568 с.
31. Тен Э.В. Экспресс - метод определения активности церуплазмина в сыворотки крови./ Лабораторное дело. – 1981 . - № 6 – с. 334-335.

32. Топурия Л.Ю., Садников А.А., Топурия Г.М. Фармокоррекция иммунодефицитных состояний у животных. /Монография. – Оренбург: издательский центр ОГАУ, 2008. – 176 с.

33. Хазипов Н.З. Биохимия животных / Н.З. Хазипов, А.Н. Аскарлова. - Казань, 1999. - 292 с.

34. Шахов А.Г., Смирнов А.М. Методические рекомендации по применению унифицированных биохимических методов исследования крови, мочи, молока. / Москва – 2001. – 76 с.

35. Bidlack W.R., Tappel A.L. Fluorescent Products of Pholipids during Lipid Peroxidation. / Lipids. -1973. - v. 8, №4. – p. 203-207.

36. Civan A.L. Flow cytometry: First Principles. New York, -1992. -202 p.