

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЕ И ЭНЗИМАТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА СЫВОРОТКИ КРОВИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Д.С. Большаков¹, Т.Б. Никешина²

¹ научный сотрудник, кандидат химических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: bolshakov@arriah.ru

² заведующий лабораторией, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: nikeshina@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В работе описаны традиционные и современные принципы спектрофотометрического и энзиматического определения основных биохимических показателей сыворотки (плазмы) крови животных: общего белка, альбумина, мочевины, мочевой кислоты, креатинина, билирубина (общего и прямого), глюкозы, молочной кислоты, триглицеридов, холестерина, фосфолипидов, кальция, магния, фосфора, калия, натрия, железа, хлоридов, щелочной фосфатазы, лактатдегидрогеназы, креатинкиназы, α -амилазы, аспаратаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, холинэстеразы, γ -глутамилтранспептидазы и гемоглобина.

Ключевые слова: биохимический анализ, биохимические показатели, сыворотка крови сельскохозяйственных животных.

SPECTROPHOTOMETRIC AND ENZYMATIC METHODS FOR BIOCHEMICAL ANALYSIS OF BLOOD SERA FROM FARM ANIMALS

D.S. Bolshakov¹, T.B. Nikeshina²

¹ researcher, Candidate of Science (Chemistry), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: bolshakov@arriah.ru

² head of laboratory, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: nikeshina@arriah.ru

SUMMARY

Conventional and present-day principles of spectrophotometric and enzymatic determination of major biochemical values of animal blood serum (plasma) are described in the paper: total protein, albumin, urea, uric acid, creatinine, bilirubin (total and conjugated bilirubin), glucose, lactic acid, triglycerides, cholesterol, phospholipids, calcium, magnesium, phosphorus, potassium, sodium, ferrum, chlorides, alkaline phosphatase, lactate dehydrogenase, creatine kinase, α -amylase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, cholinesterase, γ -glutamyltransferase and hemoglobin.

Key words: biochemical analysis, biochemical values, blood sera from farm animals.

ВВЕДЕНИЕ

Успехи в животноводстве в значительной степени зависят от четкой работы ветеринарной службы. В связи с этим следует уделять большое внимание своевременному и качественному выполнению ветеринарных мероприятий, направленных на ликвидацию различных болезней сельскохозяйственных животных, регулярно осуществлять научно обоснованную и специфическую профилактику. Именно проведение биохимического анализа сыворотки крови и биологических жидкостей позволяет проводить своевременную диагностику (при отсутствии клинического проявления) болезней. Кроме того, биохимические исследования дают возможность контролировать и полноценность используемых кормов.

При проведении биохимических исследований используют рефрактометрические, флуориметрические, поляриметрические, нефелометрические, турбидиметрические, электрофоретические, хроматографические методы, а также методы пламенной фотометрии и атомно-абсорбционной спектроскопии для определения элементного состава. Среди всех методов следует выделить группу спектрофотометрических и энзиматических (ферментных) методов, которые по избирательности и чувствительности не уступают хроматографическим методам (ВЭЖХ, ТСХ), а по доступности и простоте выполнения измерений существенно превосходят их.

Цель данной работы заключалась в рассмотрении существующих принципов спектрофотометрического и энзиматического определения основных биохимических показателей проб биоматериалов.

ПОКАЗАТЕЛИ БЕЛКОВОГО ОБМЕНА

Общий белок. Белки относятся к высокомолекулярным соединениям; в их состав входит более 20 видов α -L-аминокислот, соединенных между собой пептидной связью (-CO-NH-). Различают простые и сложные белки. Простые белки состоят только из аминокислот, в сложные входят и другие вещества: в липопротеиды — липиды, в гликопротеиды — углеводы, в нуклеопротеиды — нуклеиновые основания.

Колориметрическая реакция между молекулами белка и ионами меди, так называемая биуретовая реакция, известна с 1848 г. [6]. В 1914 г. была опубликована работа Regler и соавт., и с этого времени основное внимание было уделено стабилизации ионов меди в щелочном реагенте. В 1939 г. Kingsley и соавт. модифицировали процедуру, а в 1942 г. предложили использовать в качестве комплексона тартрат натрия или калия. Впоследствии эта процедура была модифицирована Weichselbaum и соавт., Gornall и соавт. Принцип метода заключается в том, что белок сыворотки в щелочной среде при взаимодействии с ионами меди образует фиолетовый комплекс [3, 5–8] (таблица). Абсорбция образовавшегося комплекса прямо пропорциональна концентрации белка в исследуемом образце.

Альбумин — простой белок, синтезирующийся в печени; в плазме крови поддерживает коллоидно-осмотическое давление, играет важную роль в транспорте многих веществ экзогенного и эндогенного происхождения.

Для определения сывороточного альбумина методы фракционного высаливания были слишком трудоемки и заменены методами с применением азокрасителей. Использование реакции с бромкрезоловым зеленым

[6–8, 10] стало предпочтительным методом из-за высокой специфичности к альбумину и незначительному влиянию на данную реакцию гемолиза, билирубина и салицилатов. Суть метода заключается в избирательном взаимодействии альбумина с бромкрезоловым зеленым при pH 4,2 (таблица). Увеличение поглощения образующегося комплекса альбумин—краситель при 630 нм прямо пропорционально концентрации альбумина.

Менее специфичными являются методы определения альбумина с бромкрезоловым красным, метиловым оранжевым и натриевой солью 2-(4-оксиазобензол)-бензойной кислоты [6].

ПОКАЗАТЕЛИ АЗОТИСТОГО ОБМЕНА

Мочевина — осмотически активное вещество, играющее важную роль в механизмах концентрирования мочи. Синтез мочевины происходит в печени главным образом из аммиака, который образуется при дезаминировании аминокислот, распаде пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов.

Мочевину определяют прямым методом, в котором при взаимодействии с диацетилдом (или диацетилмонооксимом) образуется хромоген [3, 5–7, 9], и непрямой методом, в котором измеряют концентрацию аммиака как продукта воздействия уреазы на мочевину. Выделенный аммиак можно измерить фотометрически с использованием реактива Несслера и по реакции Berthelot с гипохлоритом и фенолом [3]. В 1965 г. Talke и Shubert ввели общую энзиматическую процедуру с использованием уреазы и глутаматдегидрогеназы [8]: мочевина гидролизует уреазой, при этом образуется аммиак и углекислый газ. Выделенный аммиак в присутствии NADH¹ взаимодействует с α -кетоглутаратом с образованием глутамата. В результате реакции NADH подвергается окислению, что сопровождается уменьшением абсорбции (оптический тест Варбурга [6]), интенсивность которой прямо пропорциональна концентрации мочевины в исследуемом образце (табл.).

Мочевая кислота является конечным продуктом распада пуриновых оснований. Образовавшаяся мочевая кислота выделяется почками.

Для определения мочевой кислоты в сыворотке крови используются спектрофотометрические [3, 6–8, 10], энзиматические [8] и другие методы. Наиболее специфические и точные — ферментативные (уреазные) методы. В основе определения лежит реакция окисления мочевой кислоты уриказой до аллантаина и перекиси водорода [8]. В присутствии пероксидазы перекись водорода инициирует присоединение 4-аминоантипирина к дихлор-2-гидроксibenзолсульфонату натрия (ДХГБС) с образованием хромогена, абсорбция которого измеряется при 520 нм (таблица). Оптическая плотность раствора прямо пропорциональна количеству перекиси водорода, образуемому из мочевой кислоты.

Необходимо отметить, что первый метод определения мочевой кислоты был предложен Folin O., Denis W. в 1912 г. Он основан на способности мочевой кислоты восстанавливать фосфорно-вольфрамовую кислоту

¹ NAD (НАД) — никотинамидениндинуклеотид (существует в двух формах: окисленной (NAD⁺) и восстановленной (NADH)).

с образованием окрашенного соединения. Впоследствии метод подвергался многочисленным модификациям и до настоящего времени остается одним из наиболее распространенных [3, 6, 7, 9].

Креатинин — конечный продукт креатин-фосфатной реакции: креатин при фосфорилировании превращается в креатинфосфат, из которого образуется

креатинин (ангидрид креатина). Креатинин участвует в энергетическом обмене мышечной и других тканей. Из организма выводится почками с мочой, поэтому креатинин (его количество в крови) — важный показатель функционирования почек.

Измерение содержания креатинина в сыворотке крови основано на реакции его взаимодействия с пи-

Таблица
Принципы спектрофотометрического и энзиматического определения основных биохимических показателей сыворотки (плазмы) крови сельскохозяйственных животных

Показатель	Принцип метода ¹	Длина волны УФ-излучения, нм	Хранение и стабильность образцов ²
1	2	3	4
Общий белок	Белок + Cu ²⁺ [рН>7,0] → Окрашенный комплекс	540	Концентрация общего белка в сыворотке крови стабильна в течение недели при комнатной температуре 15–30 °С, один месяц в холодильнике при 2–8 °С
Альбумин	Альбумин + Бромкрезоловый зеленый [рН 4,2] → Комплекс Альбумин—Краситель	630	Альбумин в сыворотке стабилен в течение одной недели при комнатной температуре (15–30 °С) и приблизительно одного месяца при хранении в холодильнике (2–8 °С)
Мочевина	1) Мочевина + Н ₂ O [Уреаза] → 2NH ₃ + CO ₂ ; 2) NH ₃ + α-Кетоглутарат + NADH + H ⁺ → L-глутамат + NAD + H ₂ O	340	Сыворотка сразу же должна быть отделена от кровяного сгустка, так как скорость снижения содержания глюкозы в цельной крови приблизительно 7% в час. Концентрация мочевины в сыворотке крови стабильна в течение 72 ч в холодильнике при 2–8 °С
Глюкоза	1) β-D-Глюкоза + Н ₂ O + O ₂ [Глюкозооксидаза] → Н ₂ O ₂ + D-Глюконовая кислота; 2) Н ₂ O ₂ + 4-Аминоантипирин + Фенол (Пероксидаза) → Хинониминный краситель + Н ₂ O	500–520	Глюкоза в сыворотке стабильна в течение 24 ч при 2–8 °С
Молочная кислота	1) Лактат + O ₂ + Н ₂ O [Лактатоксидаза] → Пируват + Н ₂ O ₂ ; 2) 2Н ₂ O ₂ + 4-аминоантипирин + ТООС [Пероксидаза] → Хинониминный краситель + Н ₂ O	550	Для анализа лучше всего использовать плазму крови с оксалатом калия или натрия в качестве антикоагулянтов. Образцы плазмы можно хранить в течение двух дней в холодильнике при 2–8 °С и 1 месяц при –20 °С
ЩФ	p-Нитрофенилфосфат + Н ₂ O [ЩФ] → p-Нитрофенол + Н ₃ РО ₄	405	Образцы должны храниться в холоде, их необходимо анализировать сразу после сбора биоматериала, т.к. уровень ЩФ в сыворотке значительно увеличивается со временем в процессе хранения при 2–8 °С или при комнатной температуре. Может использоваться гепаринизированная плазма ³
Холестерин	1) Эфир холестерина [Холинэстераза] → Холестерин + Жирные кислоты; 2) Холестерин + O ₂ [Холестерин оксидаза] → Холестерин-3-он + Н ₂ O ₂ ; 3) Н ₂ O ₂ + 4-Аминоантипирин + n-ГБС [Пероксидаза] → Хинониминный краситель + 2Н ₂ O	520	Холестерин в сыворотке стабилен в течение 7 дней при комнатной температуре (18–25 °С) и в течение 6 месяцев в замороженном виде и в условиях, препятствующих испарению ³
Кальций	Ca ²⁺ + Арсенazo III → Комплекс Ca ²⁺ —Арсенazo III (сине-фиолетовая окраска становится розовой)	670	Свежую плазму следует исследовать сразу. Образцы сыворотки стабильны как минимум 7 дней при температуре 20–25 °С, 3 недели — при температуре 4–8 °С или 8 месяцев при –20 °С

Таблица
Принципы спектрофотометрического и энзиматического определения основных биохимических показателей сыворотки (плазмы) крови сельскохозяйственных животных (Продолжение)

Показатель	Принцип метода ¹	Длина волны УФ-излучения, нм	Хранение и стабильность образцов ²
1	2	3	4
Триглицериды	1) Триглицериды [Липаза] → Глицерин + Жирные кислоты; 2) Глицерин + АТР [Глицерин киназа] → Глицерин-1-фосфат + ADP; 3) Глицерин-1-фосфат + O ₂ [Глицерин фосфат оксидаза] → DAP + Н ₂ O ₂ ; 4) Н ₂ O ₂ + 4-Аминоантипирин + n-ГБС [Пероксидаза] → Хинониминный краситель + 2 Н ₂ O	520	Триглицериды в сыворотке стабильны в течение 3 дней при 2–8 °С. Не рекомендуется длительное хранение образцов при комнатной температуре, так как могут подвергнуться гидролизу с высвобождением глицерина другие соединения
ФЛ	1) Фосфолипиды + Н ₂ O [Фосфолипаза] → Холин + Фосфорная кислота; 2) Холин + 2O ₂ + Н ₂ O [Холинэстераза] → Бетаин + 2Н ₂ O ₂ ; 3) 2Н ₂ O ₂ + 4-аминофеназон + дихлорфенол [Пероксидаза] → Кинонимин + 4Н ₂ O	505	ФЛ стабильны в сыворотке или в плазме крови в течение 1 дня при комнатной температуре и 1 неделю при хранении в холодильнике (2–8 °С)
ЛДГ	L-Лактат + NAD [ЛДГ] → Пируват + NADH + H ⁺	340	ЛДГ в сыворотке стабильна в течение 2–3 дней при комнатной температуре. ЛДГ печени очень нестабильна и может разрушаться при замораживании–оттаивании сыворотки ³
КК	1) Креатинфосфат + АДФ [КК] → Креатин + АДФ; 2) АДФ + D-глюкоза [Гексокиназа] → Глюкозо-6-фосфат + АДФ; 3) Глюкозо-6-фосфат + NAD [Глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа] → 6-Фосфоглюконат + NADH + H ⁺ ;	340	Сыворотка стабильна в течение 4 ч при комнатной температуре, 8–12 ч при 4 °С и 2–3 дня при заморозке
Гемоглобин ⁴	1) ГГ + K ₂ [Fe(CN) ₆] → Метгемоглобин; 2) Метгемоглобин + KCN → Цианметгемоглобин;	540	Цельная кровь с антикоагулянт (ЭДТА, оксалатами, цитратами или гепарином) стабильна в течение одной недели при комнатной температуре 15–30 °С
АЛТ	1) L-Аланин + α-Кетоглутарат [АЛТ] → Пируват + L-глутамат; 2) Пируват + NADH + H ⁺ [ЛДГ] → L-Лактат + NAD ⁺ + Н ₂ O	340	Концентрация фермента стабильна в течение 3 дней при комнатной температуре (15–30 °С), 7 дней в холодильнике при 2–8 °С и 30 суток в холодильнике при +20 °С
АСТ	1) L-Аспартат + 2-Оксоглутарат [АСТ] → Оксалоацетат + L-Глутамат; 2) Оксалоацетат + NADH + H ⁺ [МДГ] → Лактат + NAD ⁺ + Н ₂ O;	340	Хранить сыворотку в пробирке с плотно закрытой крышкой. Фермент в сыворотке стабилен как минимум в течение 7 дней при 2–8 °С. Можно использовать плазму, обработанную ЭДТА или гепарином
Холинэстераза	1) Бутирилтиохолин + Н ₂ O [Холинэстераза] → Тиохолин + Бутират; 2) Тиохолин + 5,5'-дитио-бис-(2-нитро-бензойная кислота) → 2-нитро-5-меркаптобензоат	405	Активность холинэстеразы заметно не изменяется при хранении сыворотки в герметически закрытых пробирках в холодильнике при температуре 2–6 °С в течение 4 дней
ГГТ	L-γ-глутамил-p-нитроанилид + Глицилглицин [ГГТ] → L-γ-глутамил-глицилглицид + p-Нитроанилид	405	Активность ГГТ не изменяется в течение 7 дней при хранении сыворотки при 4 °С и в течение 3 месяцев при –20 °С
Хлориды	1) Hg(SCN) ₂ + 2Cl ⁻ → HgCl ₂ + 2(SCN) ⁻ ; 2) 3(SCN) ⁻ + Fe ³⁺ → Fe(SCN) ₃ (красное окрашивание)	480	Хранить образцы сыворотки крови в пробирке с плотно закрытой крышкой. Концентрация хлоридов в сыворотке стабильна в течение одного дня при комнатной температуре (18–25 °С) и три месяца в холодильнике при –20 °С

Таблица
Принципы спектрофотометрического и энзиматического определения
основных биохимических показателей сыворотки (плазмы) крови сельскохозяйственных животных
(Окончание)

Показатель	Принцип метода ¹	Длина волны УФ-излучения, нм	Хранение и стабильность образцов ²
1	2	3	4
Натрий	o-Нитрофенил-β-D-гликозида [Na ⁺ , β-галактозидаза] → o-Нитрофенол + Галактоза	405	-
Билирубин	Билирубин (общий) + Сульфаниловая кислота + NaNO ₂ [ДМСО] → Азобилирубин; Билирубин (прямой) + Сульфаниловая кислота + NaNO ₂ [H ₂ O] → Азобилирубин;	560	Все образцы должны быть тщательно защищены от света. Билирубин в сыворотке стабилен в течение 4–7 дней при хранении в холодильнике (2–8 °С) и в темноте
Креатинин	Креатинин + Пикрат натрия [Щелочная среда] → Комплекс Креатинин-Пикрат (желто-оранжевый)	510	Креатинин в сыворотке крови стабилен в течение 24 ч при хранении в холодильнике (2–8 °С) и в течение нескольких месяцев в замороженном виде (–20 °С) и в условиях, защищенных от испарения и загрязнения
Мочевая кислота	1) Мочевая кислота + O ₂ + 2H ₂ O [Уриказа] → Аллантин + CO ₂ + H ₂ O ₂ ; 2) 2H ₂ O ₂ + 4-Аминоантипирин + ДХГБС [Пероксидаза] → Хромоген + 4H ₂ O	520	Концентрация мочевой кислоты в сыворотке стабильна в течение трех дней в холодильнике при 2–8 °С и шесть месяцев при –20 °С
Железо	1) Железо(Fe ³⁺)-Железосвязывающий белок [Кислотный буферный раствор] → Fe ³⁺ + Трансферрин; 2) Fe ³⁺ + Гидроксиламин + Тиогликолят → Fe ²⁺ ; 3) Fe ²⁺ + Феррозин → Fe ²⁺ -Феррозин (пурпурно-красный конъюгат)	560	Отделенную от кровяного сгустка сыворотку хранить при комнатной температуре не более 8 ч; при 2–8 °С не более 48 ч
Магний	Магний + Кальмагит → Окрашенный комплекс	530	Использовать свежие негемолизированные образцы сыворотки крови
Калий	K ⁺ + Тетрафенилборат натрия → Коллоидная взвесь	500	Для предотвращения малейшей утечки калия из внутриклеточной во внеклеточную жидкость отделить эритроциты следует как можно скорее
α-Амилаза	10 2-хлор-4-нитрофенил-α-D-мальтотриозид [Амилаза] → 9 НФФ + 2-хлор-4-нитрофенил-α-D-мальтозид + Мальтотриоза + Глюкоза	405	Отделенную сыворотку или плазму нельзя оставлять при комнатной температуре более чем на 8 часов. Если тестирование не завершено через 8 часов, необходимо поместить образцы на 2–8 °С. Если тестирование образцов не завершено через 48 ч или отделенная сыворотка хранится более 48 ч, образцы должны быть заморожены при –20 °С
Фосфор	Неорганический фосфор + H ₂ SO ₄ + Молибдат аммония → Невосстановленный фосфорномолибденовый комплекс	340	После забора и фракционирования сыворотки концентрация фосфата не изменяется как минимум в течение недели при хранении в холодильнике (2–8 °С)

¹ в скобках указан фермент, активирующий биохимическую реакцию или условия ее проведения;

² в качестве тестовых образцов должны использоваться сыворотки без гемолиза;

³ антикоагулянты, такие как оксалаты, фтористые соединения и ЭДТА, приводят к заниженным результатам данного метода;

⁴ показатель определяется в цельной крови.

кратом натрия в щелочной среде (цветная реакция Яффе, метод Поппера) [6, 8] с образованием окрашенного комплекса, поглощающего излучение при 510 нм (таблица). Скорость образования окраски пропорциональна концентрации креатинина в образце.

ПОКАЗАТЕЛИ ПИГМЕНТНОГО ОБМЕНА

Билирубин — желто-красный пигмент; представляет собой линейный тетрапиррол. Большая часть его в организме образуется в ретикулоэндотелиальной системе печени и селезенки при распаде гемоглобина, миоглобина и цитохромов.

Большинство химических методов определения общего содержания билирубина основаны на реакции между диазотированной сульфаниловой кислотой и билирубином, в результате которой образуется азобилирубин (реакция ван ден Берга [3]), имеющий максимум поглощения УФ-излучения при 560 нм (таблица). Связанный (прямой) билирубин реагирует быстро, несвязанный (непрямой) — после добавления акселераторных веществ, обладающих свойством ускорять реакцию между свободным билирубином и диазореактивом в водной среде путем повышения растворимости или каталитическим способом. В качестве акселераторов используются кофеин и бензоат натрия (метод Йендрашика–Клеггорна–Грофа) [1, 7], кофеин и мочевины, метиловый спирт, ацетамид и диметилсульфоксид (ДМСО).

ПОКАЗАТЕЛИ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА

Глюкоза — основной углевод, присутствующий в периферической крови. Окисление глюкозы — главный путь получения клетками энергии в организме.

Первые энзиматические методы для определения содержания глюкозы были основаны на использовании глюкозооксидазы, катализирующей окисление глюкозы. В начале 50-х гг. Keston модифицировал данный метод, используя ферментативную систему оксидаза/пероксидаза и o-дианизидин. После этого были предложены различные альтернативные хромогенные системы: так, канцерогенный o-дианизидин заменен на фенол с 4-аминоантипиринном. Данный метод оказывает меньшее влияние на результаты анализа и не имеет недостатков ранее предложенных методов: β-D-глюкоза окисляется глюкозооксидазой с образованием D-глюконовой кислоты и пероксида водорода [1]. В присутствии пероксидазы пероксид водорода, л-гидроксibenзолсульфоновая кислота (л-ГБС), 4-аминоантипирин и фенол образуют хинониминный краситель [8] (табл.). Концентрация образовавшегося в результате реакции окрашенного продукта пропорциональна концентрации глюкозы.

К числу спектрофотометрических методов, получивших широкое распространение, можно отнести метод определения глюкозы по цветной реакции с o-толуидином (метод Гульмана) [1, 6, 7], состоящий в определении интенсивности окрашенного раствора при взаимодействии o-толуидина с глюкозой при нагревании в растворе уксусной кислоты.

Молочная кислота (лактат) — продукт метаболизма, образующийся в результате молочной ферментации глюкозы и гликогена, который накапливается при физических упражнениях с высокой нагрузкой как результат повышения гликолитической активности. Формирование АТФ связано с образованием лактата и H⁺: при развитии утомления повышенные уровни лактата коррелируют со снижением силы.

Для определения концентрации лактата традиционно используют спектрофотометрический метод. Принцип определения основан на способности молочной кислоты в присутствии серной, фосфорной кислот и солей меди образовывать уксусный альдегид, который, реагируя с параоксидифенилом (C₆H₅C₆H₄OH), и дает фиолетово окрашенные продукты [6, 7]. Фотометрирование проводят при длине волны 565 нм. Реакция очень чувствительна, поэтому надо строго выдерживать все условия выполнения исследования.

В настоящее время все чаще применяют ферментные методы определения молочной кислоты, основанные на измерении скорости окисления лактата лактатоксидазой (реже лактатдегидрогеназой) до пирувата и перекиси водорода. Затем в присутствии 4-аминоантипирина и натриевой соли этил-N-(2-гидрокси-3-сульфопропил)-m-толуидина (TOOS) пероксидаза катализирует реакцию перекиси водорода с образованием окрашенного комплекса, абсорбция которого измеряется при 550 нм [8]. Абсорбция прямо пропорциональна концентрации лактата в исследуемом образце (таблица).

ПОКАЗАТЕЛИ ОБМЕНА ЛИПИДОВ

Триглицериды (триацилглицерины) — это нейтральные жиры, обеспечивающие клетки энергией. Как и холестерин, они доставляются к клеткам тела с помощью липопротеинов крови.

Стандартные методы определения концентрации триглицеридов основаны на использовании как ферментного, так и щелочного гидролиза с высвобождением глицерина. Современные методы основаны на использовании энзиматического гидролиза [8] и количественного определения содержания триглицеридов, так как они имеют высокую специфичность, и фосфолипиды не влияют на его результаты: триглицериды гидролизуются липазой, концентрация высвобождающегося глицерина определяется энзиматической реакцией, в результате которой образуется хинониминный краситель (таблица).

При использовании химических методов глицерин, освобожденный омылением триглицеридов, окисляют до формальдегида, концентрация последнего определяется спектрофотометрически с применением реакции Hantzsch (метод Сардеса–Маннинга) [7], по цветной реакции с хромотроповой кислотой [3] или ацетилацетоном [10].

Холестерин представляет собой вторичный одноатомный ароматический спирт, в молекуле которого имеется общее для всех стероидов полициклическое ядро циклопентанпергидрофенантрена.

Энзиматические методы определения содержания холестерина, основанные на использовании холестеринэстеразы, оксидазы и реакции Триндера, вытеснили более ранние методы. Allain и соавт. разработали общий ферментативный метод, в котором при окислении холестерина в присутствии пероксида водорода, пероксидазы, 4-аминоантипирина и фенола образуется хинониминный краситель. Реагент содержит л-ГБС и фенол, образующие краситель с максимумом поглощения при 520 нм, а также сурфактант для обеспечения полного протекания реакции [8]. Интенсивность окраски раствора пропорциональна концентрации холестерина в пробе. Реакции получения хромогена предшествует гидролиз эфиров холестерина с образованием холестерина (таблица).

Несмотря на высокую специфичность энзиматических методов, большое распространение для определения холестерина в сыворотке крови получил метод Ильяка [1, 3, 5–7, 9]. В его основу положена модифицированная реакция Либермана–Бурхарда, которая приводит к изумрудно-зеленому окрашиванию раствора в присутствии холестерина и смеси ледяной уксусной кислоты, уксусного ангидрида и концентрированной серной кислоты.

Фосфолипиды (фосфатиды, ФЛ) представляют собой группу липидов, содержащих помимо фосфорной

кислоты (в качестве обязательного компонента) также спирт (обычно глицерин), жирные кислоты и азотистые основания. По природе спирта ФЛ можно разделить на фосфоглицериды, фосфосфингозины и фосфоинозитиды.

Об общей концентрации ФЛ обычно судят по содержанию в них липидного фосфора, на долю которого приходится 4% молекулярного веса ФЛ (справедливо для фосфотидилхолинов (лецитинов) [7]). Так, метод Бартлетта–Ушера основан на минерализации липидов с помощью хлорной кислоты. Неорганический фосфор, взаимодействуя с молибдатом аммония, образует фосфомолибденовую кислоту, которую восстанавливают эйконогеном и пиросульфитом натрия в молибденовую синь. По степени окраски вычисляют количество неорганического фосфора, содержащегося в ФЛ.

Поскольку данный метод достаточно трудоемкий, требует проведения стадии экстракции липидов (как правило по методу Фолча [3, 7]), в рутинных лабораторных исследованиях используют энзиматический метод [8], основанный на гидролизе ФЛ фосфолипидов. Высвобождающийся холин затем окисляется холинсцидазой в бетанин с образованием перекиси водорода. В присутствии пероксидазы перекись водорода связывается с 4-аминофеназоном и дихлорфенолом с формированием комплекса кинонимина, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации ФЛ (таблица).

ПОКАЗАТЕЛИ МИНЕРАЛЬНОГО ОБМЕНА

Кальций — это наиболее распространенный и один из наиболее важных элементов в организме человека и животных. Примерно 99% всего кальция находится в костях.

Определение кальция в сыворотке крови основано на образовании окрашенного комплекса с Арсеназо III [7], интенсивность окраски раствора которого прямо пропорциональна концентрации кальция в образце. Арсеназо III — металлокомплекс из группы диазокомплексобразователей, которые имеют неодинаковое сродство к различным ионам металлов. Наибольшее сродство проявляется к ионам Th^{4+} , UO_2^{2+} , Zr^{2+} , Pu^{4+} , меньшее — к ионам Ba^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{+} . Из этих ионов в сыворотке крови в значительном количестве присутствует только ион Ca^{2+} . Соотношение кальция и присителя для образования комплекса: одна часть образца на 100 частей реагента.

В качестве комплексона при определении кальция может быть использован глиоксаль-бис-[2-оксианил] [3, 6] и *o*-крезолфталеин [6, 8, 9].

Магний — это второй по распространенности внутриклеточный катион в организме животных и человека после калия, он участвует в большом количестве ферментативных и метаболических процессов.

Метод определения концентрации магния впервые был предложен Kramer, Tisdall, Briggs и соавт. в 20-х гг. Впоследствии было разработано несколько методик его определения: комплексометрическое титрование с ЭДТА, флуориметрическая процедура с использованием специфических хелатирующих агентов и спектрофотометрический метод, в основе которого лежит реакция титана желтого и гидроксида магния с образованием красного пигмента [3, 5–7, 9]. Все эти методы имели недостатки, которые отражались на точности результатов. Атомная абсорбция является методом, позволяющим наиболее точно определять

концентрацию магния. Данный метод требует дорогостоящего оборудования и большого объема исследуемого материала.

Совсем недавно был предложен спектрофотометрический метод, который стал наиболее популярным. В качестве окрашивающих агентов используют кальмагит, ксилитидиловый голубой [8], эриохромовый черный Т, магон [6] или метилтимоловый голубой. При использовании металлохромного индикатора кальмагита нет необходимости проводить депротеинизацию, и результаты анализа имеют высокую сходимость с данными атомной абсорбции: ионы магния реагируют с кальмагитом в щелочной среде, при этом формируется комплекс, имеющий красное окрашивание (табл.). Абсорбция измеряется при 530 нм и пропорциональна концентрации магния в исследуемом образце. Влияние кальция устраняется при использовании ЭДТА. Влияние тяжелых металлов и белков устраняется при использовании цианидов и сурфактанта соответственно.

Фосфор — это важнейший элемент для формирования тканей кости, и он необходим для нормального функционирования каждой клетки организма. Примерно 85% фосфора организма животных и человека находится в костях и зубах.

Определение содержания неорганического фосфора в сыворотке крови основано на взаимодействии молибдата аммония с фосфатами в кислой среде с образованием фосфорномолибденового комплекса, имеющего синюю окраску, без проведения депротеинизации [8]. Поглощение при 340 нм прямо пропорционально количеству неорганического фосфора, содержащегося в образце (таблица). Возможно последующее восстановление полученного комплекса эйконогеном [3] или аскорбиновой кислотой [1, 7].

Неорганический фосфор в сыворотке крови может быть определен и с ванадат-молибденовым реактивом (по Пулсу в модификации В.Ф. Коромыслова и Л.А. Кудрявцевой) [5–7, 9], с которым фосфор дает лимонно-желтое окрашивание. Максимум светопоглощения комплекса приходится на 420 нм.

Калий и натрий. Традиционно измерение концентрации натрия и калия в биологических жидкостях проводится методом пламенной фотометрии [5–7, 9], который представляет собой один из видов эмиссионного спектрального анализа, основанного на фотометрировании излучения элементов в пламени. Натрий окрашивает пламя в ярко-желтый цвет, а калий — в слабый красно-фиолетовый. Добавление к распыленным растворам органических реагентов, являющихся поверхностно-активными веществами, увеличивает яркость свечения пламени.

Однако современный уровень развития биохимического анализа позволяет проводить определение концентрации ионов натрия и калия спектрофотометрическими методами, которые являются более доступными в сравнении с методами элементного анализа. Уровень натрия определяется ферментативным методом по степени активности натрийзависимой β -галактозидазы с *o*-нитрофенил- β -D-гликозидом в качестве субстрата. Абсорбция образующегося *o*-нитрофенила при 405 нм пропорциональна концентрации натрия.

Многие описанные методы спектрофотометрического определения калия или натрия требовали предварительной депротеинизации сыворотки или плазмы. В настоящее время количество калия определяется с помощью тетрафенилбората натрия в специально

приготовленной смеси для получения коллоидных взвесей, мутность которой пропорциональна концентрации калия в диапазоне от 2 до 7 мэкв/л [8].

Железо — микроэлемент, содержащийся в организме в наибольшем количестве. Основная часть железа расположена внутри гема в гемоглобине, каталазе, миоглобине, пероксидазе и цитохромах. Железо аккумулируется в форме, связанной с ферритином или гемосидерином, а переносится с помощью трансферрина.

Как было сказано, практически все железо в организме связано белками. Железо в свободной форме не только не растворимо, но и токсично. Принципиально важен тот факт, что образцы сыворотки крови следует анализировать не только на общее железо, но и на железосвязывающую способность, так как оба вышеуказанных параметра крайне важны для диагностики различных типов анемий и заболеваний печени. Определение железа основано на том, что при добавлении содержащего гидроксилламин кислотного буферного раствора железо сыворотки высвобождается из Fe^{3+} -трансферринового комплекса. Железо (III) восстанавливается до железа (II). Ионы железа реагируют с окрашенным агентом (феррозин), что приводит к образованию яркоокрашенного комплекса [8]. Абсорбция измеряется фотометрически при длине волны 560 нм (таблица).

В качестве альтернативного можно использовать метод определения железа по цветной реакции с β -фенантролином [3, 6, 7]: белки осаждают трихлоруксусной кислотой, которая при прогревании разрушает комплекс железа с трансферрином. Для установления оптимальной величины pH (4,8–5,0) добавляют ацетат аммония, а для восстановления всего железа — гидрозин. Двухвалентное железо образует окрашенный комплекс с β -фенантролином, который переведен в сульфатированную форму добавлением хлорсульфоновой кислоты.

Хлориды. Для клинического анализа важно определять концентрацию хлоридов, так как они регулируют осмотическое давление внеклеточной жидкости и играют значительную роль в кислотно-щелочном балансе [2].

В 1978 г. хлориды определяли по реакции precipitation в виде хлорида серебра после титрования избытка нитрата серебра тиоцианатным раствором. С этого времени было предложено много методов, включая ртутное титрование с использованием в качестве индикатора дифенилкарбазона [3, 6]. Электрохимический метод был впервые представлен в 1950 г. Он основан на инкубации хлоридсодержащего раствора с электродами, выделяющими катион серебра в кислой среде. Время, необходимое для образования осадка в виде хлорида серебра, прямо пропорционально концентрации хлоридов в исследуемом растворе. Больше распространение в биохимическом анализе получил метод, предложенный в 1950 г., в основе которого лежит следующий принцип: ионы хлора замещают тиоцианат из неионизированного тиоцианата ртути, при этом образуется хлорид ртути и тиоцианат-ионы [8]. Образовавшиеся тиоцианат-ионы реагируют с ионами железа с формированием окрашенного комплекса, максимум светопоглощения которого приходится на 480 нм. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна концентрации хлоридов в исследуемой сыворотке крови.

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ

Щелочная фосфатаза (ЩФ) (фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты, фосфомоноэстераза 1) — фермент гидролаза, отщепляющий фосфат (дефосфорилирование) от многих типов молекул, например, нуклеотидов, белков и алкалоидов. Фермент проявляет наибольшую активность в щелочной среде (pH от 8,6 до 10,1).

Концентрация ЩФ определяется по изменению скорости гидролиза различных фосфатных эфиров [5–9]. *n*-Нитрофенилфосфат — один из таких эфиров, использовался как субстрат Fujita в 1939 г. Bowers и McComb в дальнейшем модифицировали процедуру кинетического анализа. В 1974 г. Комитет по энзимологии Скандинавского общества клинической химии и клинической физиологии принял модификацию данного метода и рекомендовал его в качестве референсного. Скорость увеличения поглощения излучения при 405 нм, обусловленная образованием *n*-нитрофенола в процессе гидролиза *n*-нитрофенилфосфата, пропорциональна активности фермента [8]. Более известен как метод Бессея–Лоури–Брока [1, 3].

В качестве других энзиматических методов можно использовать метод Боданского и Кинга–Армстронга. Метод Боданского основан на ферментативном гидролизе β -глицерофосфата с освобождением неорганического фосфора, определяемого фотометрически [3, 6–7, 9]. А в основе метода Кинга–Армстронга лежит ферментативное расщепление фенилфосфата [3, 6]. Освобожденный в результате реакции фенол определяют фотометрически с реактивом Фолина.

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) (L-лактат: NAD-оксидоредуктаза) — гликолитический фермент, открытый Мейергофом в 1918 г., катализирует обратимую реакцию восстановления пировиноградной кислоты в молочную. Обнаружены пять изоферментов ЛДГ, отличающихся по мобильности.

Возможно измерение активности ЛДГ по прямой и обратной реакции (таблица). При оптимальных условиях реакция может протекать как в прямом, так и в обратном направлении. Хотя использование в кинетических измерениях реакции превращения лактата лития в пируват предпочтительнее, так как: 1) скорость реакции линейна на широком диапазоне активности фермента, 2) не требуется предварительная инкубация реакционной среды, 3) реагенты более стабильны. Кинетический метод основан на том, что ЛДГ катализирует окисление L-лактата до пирувата в присутствии NAD, который одновременно восстанавливается до NADH (оптический тест Варбурга) [8]. Скорость образования NADH измеряется при 340 нм, она прямо пропорциональна активности ЛДГ в сыворотке.

Широкое распространение получил и динитрофенилгидразиновый метод [1, 3, 6, 7], основанный на определении пирувата (пировиноградной кислоты) по цветной реакции с 2,4-динитрофенилгидразином (метод Севела–Товарека).

Креатинкиназа (КК) (АТФ: креатин-N-фосфотрансфераза) — фермент, катализирующий обратимую реакцию фосфорилирования креатина.

Изначально определение КК было основано на измерении количества образованного АТФ (таблица). Усовершенствованный метод был описан Nielson и основан на добавлении соединений, содержащих сульфогруппы.

гидрильную группу и АМФ². Данный метод гарантирует максимальную активность КК и ингибирование активности аденилаткиназы: КК способствует превращению креатинфосфата и АДФ³ в креатин и АТФ. Затем АТФ и глюкоза превращаются в АДФ и глюкозо-6-фосфат при участии гексокиназы. Глюкозо-6-фосфат окисляется до 6-фосфоглюконата под действием глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы, что приводит к уменьшению содержания NAD [8]. Концентрация NADH, измеренная при 340 нм, прямо пропорциональна активности КК в сыворотке.

α-Амилаза (1,4-*α-D*-глюкан-глюканогидролаза) — один из первых открытых ферментов; катализирует эндогидролиз *α*-1,4-глюкозидных связей крахмала, гликогена и родственных им полисахаридов до мальтозы, декстринов и других полимеров.

В основе спектрофотометрического метода определения амилазы лежит реакция гидролиза 2-хлор-4-нитрофенил-*α-D*-мальтатриозида *α*-амилазой с высвобождением 2-хлор-4-нитрофенила (ХНФ) и образованием 2-хлор-4-нитрофенил-*α-D*-мальтозида, мальтотриозы и глюкозы [8]. Скорость образования ХНФ измеряется фотометрически, величина поглощения пропорциональна концентрации амилазы в образце (таблица).

Активность амилазы может быть оценена амилотометрическим методом и методом Каравея (со стойким крахмальным субстратом) [1, 3, 6, 7], основанным на фотометрическом определении концентрации крахмала до и после его ферментативного гидролиза.

Аспартаминотрансфераза (АсАТ, АСТ) и аланинаминотрансфераза (АлАТ, АЛТ) катализируют обратимый перенос аминокислот с L-аспарагиновой кислоты и L-аланина на *α*-кетоглутаровую кислоту.

УФ-метод для определения АлАТ был описан Henley в 1955 г., Wroblewski и La Due в 1956 г., Henry и соавт. в 1960 г. В 1980 г. Международная федерация клинической химии (МФКХ) рекомендовала совместное использование лактатдегидрогеназы-NADH. Принцип метода основан на каталитической реакции переноса аминокислоты с L-аланина на *α*-кетоглутарат с образованием пирувата и L-глутамата под действием АлАТ. ЛДГ подвергается окислению, при этом NADH окисляется до NAD. Уровень снижения абсорбции прямо пропорционален активности АлАТ [6, 8, 10].

Первые кинетические измерения активности АсАТ в диагностических целях были описаны Karmen и соавт. В 1955 г. они проводились с использованием сопряженной реакции в присутствии малатдегидрогеназы (МДГ) и NADH. Данная система измерения была значительно улучшена и оптимизирована в 1960 г. Henry и соавт. В 1977 г. МФКХ рекомендовала референсный метод для измерения активности АсАТ, основанный на методе Karmen [8]. Ферментативный метод определения концентрации АсАТ основан на следующей последовательности реакций: АсАТ катализирует перенос аминокислоты между L-аспаратом и 2-оксоглутаратом. Образующийся в первой реакции оксалоацетат реагирует с NADH в присутствии МДГ с образованием NAD. Активность АсАТ определяется измерением скорости окисления NADH при 340 нм (таблица). ЛДГ превращает эндогенный пируват, содержащийся в образце, в лактат в течение лаг-фазы, предшествующей измерению.

Возможно определение активности аминотрансфераз по методу Райтмана-Френкеля (1957), который основан на получении окрашенных динитрофенилгидразонов щавелевоуксусной (оксалоацетата) и пировиноградной (пирувата) кислот [3, 6, 7].

Холинэстераза. Различают два типа холинэстераз — ацетилхолинэстеразу, или истинную холинэстеразу (АХЭ, ацетилхолин-ацетилгидролаза), и псевдохолинэстеразу (ХЭ, ацилхолин-ацетилгидролаза). Истинная холинэстераза содержится преимущественно в эритроцитах, нервной и мышечной тканях; псевдохолинэстераза — в сыворотке крови, печени, поджелудочной железе. АХЭ и ХЭ различаются по ряду свойств и прежде всего по субстратной специфичности. Наиболее специфичным субстратом для истинной холинэстеразы является ацетилхолин, для псевдохолинэстеразы — бутирилхолин. Псевдохолинэстераза не отличается строгой субстратной специфичностью и гидролизует такие субстраты, как ацетилхолин, бензоилхолин, сукцинилхолин и другие эфиры холина.

Принцип определения активности холинэстеразы в сыворотке крови основан на гидролизе ацетилхолинхлорида под действием фермента с образованием уксусной кислоты и холина [3, 6, 7]. Уксусная кислота сдвигает pH буферного раствора, что устанавливается с помощью индикатора (фенолового красного [3, 6], фиолетового синего [7]) по изменению цвета буферного раствора.

Определение активности холинэстеразы в сыворотке крови возможно методом с субстратом бутирилтиохолина йодидом [6, 7]. В этом случае холинэстераза гидролизует субстрат с образованием масляной кислоты (бутирата) и тиохолина. Тиохолин взаимодействует с 5,5'-дитио-бис-(2-нитро-бензойной кислотой) с образованием 2-нитро-5-меркаптобензоата, окрашенного в желтый цвет. Активность холинэстеразы пропорциональна скорости изменения поглощения 2-нитро-5-меркаптобензоатом в индикаторной реакции при 405 нм (таблица).

γ-Глутамилтранспептидаза (ГГТ, γ-глутамил-транспептидаза) — фермент, катализирующий реакцию переноса *γ*-глутамилового остатка глутаминовой кислоты на акцепторный пептид или на L-аминокислоту. ГГТ содержится почти во всех органах, наибольшая удельная активность определяется в ткани почек.

Принцип кинетического спектрофотометрического метода определения активности основан на том, что ГГТ катализирует реакцию переноса L-*γ*-глутамилового остатка с L-*γ*-глутамил-*n*-нитроанилида на глицилглицин (метод Орловского и др.). Количество освобожденного в ходе реакции *n*-нитроанилина измеряется и служит мерой активности ГГТ [6, 7]. В качестве субстрата могут быть использованы L-*γ*-глутамиланилид (метод Гольдберга и др.) и производное L-*γ*-глутамил-*n*-нитроанилида — L-*γ*-глутамил-3-карбоксо-4-нитроанилид. В качестве буферов могут применяться трис-буфер, глицилглициновый, 2-амино-2-метил-1,3-пропандиоловый. Вид буфера почти не оказывает влияния на активность фермента. Преимущество глицилглицинового буфера состоит в том, что он одновременно является и буфером, и акцептором *γ*-глутамилового остатка [6].

ПОКАЗАТЕЛИ ОБЩЕГО КЛИНИЧЕСКОГО АНАЛИЗА КРОВИ

Гемоглобин (ГГ). Из различных методов определения уровня ГГ в крови наиболее широко используется

цианметгемоглобиновый метод. В цианметгемоглобиновом методе эритроциты лизируются стромализирующим агентом в присутствии сурфактанта, ГГ выделяется в раствор. ГГ окисляется до метгемоглобина под действием ферроцианида, а затем метгемоглобин преобразуется в стабильное соединение — цианметгемоглобин при взаимодействии с KCN. Абсорбцию цианметгемоглобина измеряют при 540 нм, и интенсивность окраски пропорциональна концентрации гемоглобина (таблица).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, достижения аналитической химии позволяют проводить определение основных биохимических показателей сыворотки крови сельскохозяйственных животных с уникальной селективностью и необходимой точностью.

Особую специфичность проявляют энзиматические методы, в которых определение активности фермента проводится по скорости изменения концентрации субстрата или аддукта реакции; количественное определение субстрата становится возможным при получении окрашенного продукта реакции. Использование энзиматических методов минимизирует стадии подготовки пробы и тем самым существенно сокращает время анализа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васильева Е.А. Клиническая биохимия сельскохозяйственных животных. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: Россельхозиздат, 1982. — 254 с.
2. Козинец Г.И. Интерпретация анализов крови и мочи и их клиническое значение. — М.: Триада-Х, 1998. — 104 с.

3. Колб В.Г., Камышников В.С. Клиническая биохимия (пособие для врачей-лаборантов). — Минск, Беларусь, 1976. — 310 с.

4. Кудрявцев А.А., Кудрявцева Л.А. Клиническая гематология животных. — М.: Колос. — 1974. — 399 с.

5. Лабораторные исследования в ветеринарии: биохимические и микробиологические: справочник / сост. Б.И. Антонов, Т.Ф. Яковлева, В.И. Дерябина [и др.]; под ред. Б.И. Антонова. — М.: Агропромиздат, 1991. — 287 с.

6. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник / В.В. Миньшиков, Л.Н. Делекторская, Р.П. Золотницкая [и др.]; под ред. В.В. Миньшикова. — М.: Медицина, 1987. — 368 с.

7. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: справочник / под ред. И.П. Кондрахина. — М.: КолосС, 2004. — 520 с.

8. Методические указания по биохимическому исследованию крови животных с использованием диагностических наборов: утв. ГУВ МСХиПРБ 27.11.2007 г. / И.Н. Дубина, А.П. Курдеко, И.В. Фомченко, И.И. Смилгин. — Витебск: УО ВГАВМ, 2008. — 60 с.

9. Методические указания по применению унифицированных биохимических методов исследования крови, мочи и молока в ветеринарных лабораториях: утв. ГУВ МСХ СССР 03.04.1981 г. / В.Т. Самохин, П.Е. Петров, И.М. Беляков [и др.]. — М.: ВАСХНИЛ, 1981. — 87 с.

10. Об унификации клинических лабораторных методов исследования (вместе с «Методическими указаниями по применению унифицированных клинических лабораторных методов исследования»): Приказ Минздрава СССР от 21.11.1979 г. №1175.

² АМФ — аденозинмонофосфат (англ. AMP);

³ АДФ — аденозиндифосфат (англ. ADP).