**Методические рекомендации к занятию №2**

**по дисциплине «Клиническая химия»**

**Тема: Объекты исследования в клинической биохимии, отбор и подготовка биологического материала для (био)химических анализов.**

Под объектом клинической биохимии понимается биологический материал, получаемый от исследуемого жи¬вотного. В целом биохимическому исследованию может подвергаться любой орган или ткань.

С точки зрения практической клинической биохимии биологический материал, получаемый от животных мож¬но классифицировать (рис 4) на универсальный, такой как кровь, моча, кал и лимфа. Исследование химического соста¬ва данных биологических объектов, отражающих функцию многих органов и систем, может иметь важное диагностиче¬ское значение при значительном числе заболеваний. Исследуется данный материал также для установления общего со¬стояния здоровья животных и уровня обмена веществ. Материал специальный (выпотные жидкости, рубцовое и желу¬дочное содержимое, мокрота, биоптаты органов и др.) - отбирается и исследуется при определенных показаниях с це¬лью дифференциации процесса и постановки диагноза. Например, выпотные жидкости, скапливающие в полостях необ¬ходимо получать и исследовать для установления типа экссудации (транссудат это, либо экссудат). Перечисленные вы¬ше биологические материалы наиболее широко используются в клинической биохимической практике. В настоящее время, особенно в медицине, уделяется внимание нетрадиционным биологическим объектам, таким как волосы, слюна, ногти и др. Например, установлен факт резкого (в 10 и более раз) падения содержания кальция в волосе при развитии инфаркта миокарда, что в настоящее время широко применяется в кардиологии.

Химический состав биологического материала вариабелен. Он может за короткий промежуток времени значи¬тельно изменяться. Поэтому для получения сопоставимых результатов необходимо соблюдать ряд правил при отборе и хранении биологического материала. Это важно, так как нормативные значения определены с учетом этих правил.

1. Отбор материала необходимо производить с учетом суточной динамики. Кровь принято отбирать утром, до кормления. При повторном исследовании отбирать материал необходимо в одно и то же время.

В течение 4часов после кормления концентрация некоторых субстратов (общий белок, глюкоза, липиды и ряд. других) повышена (к примеру, норма для содержания глюкозы в сыворотке крови у крупного рогатого скота колеблет¬ся в пределах 2,2 - 3,2 ммолъ/л, однако в течение 1 - 2 часов после кормления ее концентрация может возрастать в 2-4 и более раз, при углеводном перекорме глюкоза может кратковременно появляться в моче). У некоторых видов жи¬вотных: свиней и взрослых курей сразу после кормления ряд биохимических исследований в сыворотке крови невозмож¬ны вовсе из высокого содержания в ней жира ирядя др. веществ, придающих ей мутность.

2. Процесс отбора биологического материала должен быть максимально безболезненным и быстрым (беспо¬койство, болевая реакция, длительный венозный застой в месте инъекции значительно изменяют состав крови).

3. Взятие материала всегда проводят до лечебных процедур, особенно внутривенных инъекций электролитов, раствора глюкозы. Так же необходимо учитывать лекарственные препараты, которые вводились животному (например, вакцинация против КЧС живыми вакцинами приводит к снижению фагоцитарной активности нейтрофилов)

4. Полученный материал сразу же помещается в чистую и закрытую посуду. Контакт с внешней средой не до¬пускается. В случае, если исследуемое вещество (например, билирубин, витамин В2 и др.) разрушаются на свету, биоло¬гический материал помещают в светонепроницаемый пакет или ящик.

5. Биологические процессы продолжаются и in vitro, поэтому их необходимо минимизировать. Для этого, если не используются консерванты, наиболее подходит низкая температура. Клеточные структуры сохраняют при температу¬ре 4 - 8 0 С (не допуская замораживания). Сыворотку, плазму и другие безклеточные биологические материалы лучше сразу после получения замораживать и транспортировать в таком виде. Считается, что при температуре -25 0 С ак¬тивность ферментов минимальна. Для каждого определяемого показателя при определенных условиях существуют максимальные сроки хранения (указываются обычно в методиках).

**Кровь - основной объект клинической биохимии**, наиболее часто подвергаемый биохимическому исследованию. Пробы крови берут у животных перед кормлением или через 5 - 6 часов после кормления.

Различают стабилизированную кровь, предохраненную от свертывания посредством внесения в нее стабилиза¬тора (антикоагулянта). Она используется для получения плазмы и форменных элементов. В качестве антикоагулянгов применяют различные соли, осаждающие ионизированный кальций и другие катионы двухвалентных металлов, необходимых для свер¬тывания крови, а так же вещества животного происхождения (гепарин, герудин), блокирующих вторую фазу свертывания Наиболее часто используются следующие антикоагулянгы:

соли щавелевой кислоты (калия или натрия оксалаты) в количестве 10 - 20 мг 10 мл крови или 0,15 мл 10 %-ного

раствора;

натрий лимоннокислый прибавляют из расчета 16 мг на 10 мл крови, в 3,2 %-ном растворе берут одну часть на 19 частей крови;

трилон Б (динатривая или дикалевая соль ЭДТА - этилендиаминтетрауксусной кислоты) - 10 мгна 10 мл кро¬ви или 0,1 - 0,2 мл 10 %-ного раствора (3 - 4 капли на пробирку);

гепарин берут из расчета 50 ЕД на 10 мл крови (1-2 капли из иглы для внутрикожткинъекций).

При добавлении раствора антикоагулянта вносимый объем учитывается, т.к. он влияет на гематокритную величину. Химическое вещество, входящее в состав антикоагулянта при анализе не определяется.

Цельная кровь и другой клеточный биологический материал доставляется в лабораторию в термосе при 4 - 8

°С.

Разделение крови на плазму и форменные элементы проводят путем отстаивания и центрифугирования стаби¬лизированной крови при 500 - 800 g 10 - 20 мин.

Для получения сыворотки кровь отбирают в сухие чистые пробирки. Кровь при комнатной температуре свора¬чивается в течение 5-11 минут и при дальнейшем стоянии расслаивается. Над сгустком собирается сыворотка. Для ус¬корения отделения сыворотки в лаборатории свернувшуюся кровь отделяют от стенок пробирки спицей из нержавею-щей стали и помещают в термостат при температуре 37 - 38 °С (на 15 - 45 мин). Отделившуюся сыворотку выливают в центрифужные пробирки и центрифугируют при тех же условиях, что и плазму.

При определении значительного количества веществ в крови (например, глюкозы, мочевины, кальция, фосфо¬ра, аскорбиновой кислоты, каротина и ряда др.) необходимо освободить ее от белка. Достигается это посредством осаж¬дения белка под действием определенных химических реактивов. В качестве универсального осаждающего раствора в лабораторной практике используются 5 - 40 % растворы трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Концентрация ТХУ выбира¬ется в зависимости от степени осаждения. Конечная концентрация ее должна составлять 2,5 - 5 %. Наиболее часто сы¬воротку разводят в определенной пропорции дистиллированной водой и затем добавляютравное количество 10 % ТХУ (например, в пробирку вносится 0,1 мл сыворотки, 0,4 мл дистиллированной воды и 0,5 мл 10 % ТХУ). Хорошо осажда¬ются белки при смешивании сыворотки или плазмы крови с 96 % этанолом в соотношении 1:3. Если сыворотка, плазма или безбелковый фильтрат получены на ферме, то в лабораторию они доставляются в замороженном состоянии.

Дефектом, искажающим результаты исследований по целому ряду показателей, является гемолиз (лизис фор¬менных элементов) крови. Признакам его является равномерное окрашивание отстоявшейся плазмы или сыворотки в вишнево-красный цвет (за счет гемоглобина). Гемолизированная сыворотка практически, не для каких исследований не пригодна.

Наиболее частыми причинами гемолиза являются:

- взятие крови в шприц (вакуум, создающийся в шприце при оттянутом поршне, разрушает мембраны эритроци¬тов);

- вспенивание крови при взятии, когда струйка крови направляется не по стенке пробирки, а на дно;

- взятие крови в холодную пробирку, с наличием на стенках конденсата или замерзание ее при транспортировке в холодное время года;

- центрифугирование на больших оборотах центрифуги (более 1000 g).

**Подготовка мочи для исследований**.

Мочу у животных получают несколькими способами: при естественном акте мочеиспускания; посредством ка¬тетеризации; при помещении мелких животных в специальные клетки. При этом посуда должна быть чистой и сухой. Для проведения обычных качественных тестов подходит произвольно взятая порция мочи. При подозрении на сахарный диабет получают мочу через 2 - 3 часа после дачи корма. При подозрении на нефрит анализу подвергают утреннюю порцию мочи, поскольку она имеет более высокую относительную плотность и низкий уровень рН.

Лучше всего исследовать свежеполученную (не более 2 ч после взятия) мочу, но если такой возможности нет, то хранят ее в закрытой посуде в холодильнике (не более 36 часов) или консервируют, используя следующие вещества (рис):

- толуол - 2 млна 100 мл мочи;

- тимол (1-2 кристалика на 100-150 мл мочи), может давать ложноположительную пробу на белок;

- хлороформ или формалин (1- 2 капли на такое же количество);

- борная кислота (0,3 г на 120 мл мочи.

При проведении бактериологического исследования консервированная моча непригодна.

**Подготовка полостных жидкостей для исследований**.

По характеру полостные жидкости, которые скапливаются в полостях организма, делят на экссудаты и транс¬судаты. Получают их путем прокола стенки соответствующей полости. В лабораторию доставляют все количество пунктата, если его получено меньше 1л. При большем объеме доставляет последнюю порцию (до 1 л), так как она наи-более богата клеточными элементами. Полученную выпотную жидкость помещают в чистую, сухую посуду, добавляют стабилизаторы (натрия цитрат - 1 мг/мл, гепарин) и подвергают исследованию.

Подготовка для биохимического исследования **содержимого желудка и 12-п кишки**. Желудочное и 12-п содержимое получают посредством зондирования. Необходимо извлекать его под действием вакуума и недопустимо исследование содержимого, полученного путем промывки. Содержимое желудка и 12-п кишки сохраняется при температуре 4 - 80 С, никакие химические консерванты не используются.

**Получение тканей и предварительная подготовка их для биохимического анализа.**

Изучение метаболизма тканей и органов в процессе развития заболеваний может иметь важное диагностическое значение и осуществляется посредством биопсии.

**Биопсия - прижизненное получение ткани** (биоптата) органа для гистологического и химического исследова¬ния. В лаборатории из биоптатов готовят гомогенаты. Для приготовления гомогенатов применяют изотонические рас¬творы: 0,25 М глюкозы, 0,88 М сахарозы, 0,9 натрия хлорида. Гомогенаты получают двух типов: с разрушенными и не разрушенными клеточными органеллами. Для получения гомогенатов биоптаты отмывают от крови физиологическими жидкостями, удаляют соединительнотканные прослойки и измельчают (гомогенизируют) сначала ножницами, а затем в гомогенизаторах. Измельчения и разрушение клеток можно достичь многократным размораживанием и оттаивани¬ем ткани, а также ультразвуком.

Получение и предварительная подготовка **спинномозговой жидкости** для биохимического анализа. Ликвор (спинномозговую жидкость) подвергают исследованию с целью диагностики и дифференциальной диагностики болезней нервной системы, в первую очередь при органических поражениях головного и спинного мозга (менингоэнце-фалит, менингомиелит, кровоизлияния, новообразования и др.). Ликвор исследуют сразу же после получения, т.к. через 10-12 ч хранения спинномозговая жидкость обычно мутнеет и изменяются ее химические свойства. Не замораживать.