

**Инновационный Евразийский университет**

**МАГИСТРАТУРА**

**Кафедра «Прикладная биотехнология»**

**Магистерская диссертация**

**ИЗУЧЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КРОВИ ЛОШАДЕЙ  
ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ**

**6N0701 «Биотехнология»**

**Исполнитель** \_\_\_\_\_ **А.Т. Алибекова**  
(подпись, дата)

**Научный руководитель**

**Канд. техн. наук, профессор** \_\_\_\_\_ **М.С. Омаров**  
(подпись, дата)

**Допущена к защите:**

**Зав. кафедрой «Прикладная биотехнология»**

**Канд. техн. наук, профессор** \_\_\_\_\_ **М.С. Омаров**  
(подпись, дата)

**Павлодар, 2007**

## Содержание

Реферат	
Введение.....	3
<b>1 Раздел Литературный обзор</b>	
<b>1.1 Биохимические функции, свойства и состав крови. Переработка крови и требования к сырью.....</b>	<b>6</b>
1.1.1 Пищевая ценность крови.....	8
1.1.2 Биохимические функции.....	10
1.1.3 Морфологическая характеристика крови.....	11
1.1.4 Строение эритроцитов.....	11
1.1.4.1 Строение лейкоцитов.....	11
1.1.4.2 Строение тромбоцитов.....	12
1.1.4.3 Строение гемоглобина	13
1.1.5 Химический состав и физико-химическая свойства крови...	17
1.1.6 Плазма крови.....	20
1.1.7 Биохимические и физико-химическая свойства белков плазмы.....	21
1.1.8 Ферменты плазмы.....	24
1.1.9 Выделение методы фракционирования белков плазмы.....	25
1.1.10 Небелковые компоненты плазмы.....	27
1.1.11 Форменные элементы.....	29
<b>1.2 Биохимические превращения изъятной крови.....</b>	<b>29</b>
1.2.1 Основные свойства компонентов свертывания.....	30
1.2.2 Стабилизация крови.....	32
1.2.3 Дефибринирование изъятной крови.....	34
1.2.4 Сепарирование крови.....	35
1.2.5 Коагуляционное осаждение белков крови и консервирования.....	36
1.2.6 Обесцвечивание крови.....	37
1.2.7 Сушка крови.....	38
1.2.8 Гемолиз.....	42
1.2.9 Автолитические превращения.....	43
1.2.9.1 Биохимические превращения под воздействием микробов.....	44
1.2.10 Биологические препараты и продукты из крови.....	45
1.2.10.1 Получение альбумина.....	46
1.2.10.2 Кровяная мука.....	47
1.2.10.3 Гематоген.....	47
<b>2 Раздел Экспериментальная часть.....</b>	<b>50</b>
2.1 Материалы и методы исследования.....	51
2.2 Получение результаты.....	76
<b>3 Раздел Заключение.....</b>	<b>78</b>
Список использованной литературы.....	81
Приложения	

## Реферат

Тема магистерской диссертации «Изучение биохимического свойства лошадиной крови в производстве пищевых продуктов» Магистерская диссертация содержит 84 страниц машинописного текста, 17 таблиц, 3 иллюстраций ( см. в приложении), 23 использованных источников.

Перечень ключевых слов, представляющих собой наиболее употребляемые в работе термины и терминосочетания: мясная промышленность, биохимические методы (билирубин, трансфераза, диастаза и др.), органолептическая качества, биологическая ценность, пищевая ценность.

Объектом изучения является мясная промышленность а именно кровь убойных животных. Целью данной работы является изучение биохимических свойств лошадиной крови. Также изучены различные способы определение биохимического анализа. Сделан сравнительный анализ биохимических свойств крови лошади. Применение крови убойных животных, а именно лошади является одним из путей разработки нового вида мясных изделий на предприятиях мясной промышленности, повышения технико–экономических показателей работы предприятий, улучшения качества вырабатываемых мясопродуктов. Получить биологический ценный продукт.

## Введение

Тема магистерской диссертации – «Изучение биохимического свойства лошадиной крови в производстве пищевых продуктов».

Целью и задачей работы является изучение и исследование биохимических свойств крови лошади, используемой в производстве пищевых изделий и получении лечебных препаратов. А также изучение пищевой и биологической ценности лошадиной крови.

В соответствии с поставленной целью надо решить следующие задачи:

- изучить биохимические и химические свойства крови лошади;
- изучить пищевую и биологическую ценность крови лошади;
- изучить процесс получения цельной крови лошади, используемой в пищевых, лечебных и технических целях;
- провести биохимический и клинический анализ крови лошади.

Осуществляемая в нашей стране перестройка нашей жизни общества, экономики и техники создает для мясной промышленности благоприятные возможности в условиях интеграции сельского хозяйства и перерабатывающих отраслей для увеличения производства продукции животноводства и коренного улучшения снабжения населения страны полноценными продуктами питания.

При создании в нашей стране мясной промышленности и ее инфраструктуры в 30–х годах при формировании научных воззрений за основу были приняты биохимические представления. Этому есть ряд причин: во-первых, биохимия и в настоящее время является важнейшей наукой, объясняющей многие процессы в пищевых продуктах, во – вторых, биохимия в то время уже была оформившейся областью знаний, которые могли быть немедленно использованы для прикладных целей.

И на самом деле, биохимические представления внесли решающий вклад в становление науки о мясе, достаточно вспомнить теории созревания мяса, представления о превращениях в жирах, обоснование коагуляционных и денатурационных процессов и т. д. Роль биохимии и сегодня представляется одной из важнейших. В то время все больше в последние годы к решению отраслевых задач приходится привлекать смежные науки: биологию, биофизику, микробиологию, вычислительную технику, системный анализ и др., причем роль отдельных из них в ряде случаев становилась главной. За последние годы набирает силу биотехнологии, которая представляет собой плодотворный союз биологии, биохимии, микробиологии, генной инженерии, вычислительной техники и др. Такой синтез наук не случаен, он закономерен. XXI век крупные ученые называют веком биологии и биотехнологии.

Увеличение производства высококачественных традиционных и новых пищевых продуктов, внедрение и развитие принципиально новых интенсивных технологий возможно только при широком использовании результатов фундаментальных научных исследований в биотехнологии, реализующих современные технические и технологические решения. В настоящее время в отечественной и зарубежной промышленности формируется биотехническая индустрия с экономически замкнутым способом производства, представляющая собой промышленность целевого преобразования сырья животного

происхождения в конкретные пищевые продукты со специфическим аппаратным оформлением, системами контроля, управлением и экономикой. Бесспорно, в состав этой индустрии войдут и сложившиеся традиционные технологические процессы, обеспечивающие получение мясопродуктов высокого качества при минимизации сырьевых и энергетических затрат.

Производство мясопродуктов по существующей схеме: подсистема, производящая средства производства, агросистема и подсистема, перерабатывающая продукцию сельского хозяйства, энергетически крайне дорого. Согласно оценочным расчетам, на производстве 1 кг товарного мяса расходуется около 22 кВт \* ч энергии, причем более 80 % энергозатрат приходится на агросистему. На производстве единицы животного белка расходуется в 13 раз больше энергии и в 4 раза больше пахотных угодий, чем на производство единицы растительного белка.

По этим причинам наряду с совершенствованием системы традиционного производства мясопродуктов на основе животноводства следует рассматривать и альтернативные возможности. По-видимому, перспективное направление в пищевой технологии – создание пищевых продуктов заранее заданного состава с учетом возрастного, профессионального состава населения, а также регионального его распределения. Мы живем в технологической сфере, и если каждый из нас в той или иной степени является частью этой сферы, то и пища как необходимый компонент нашего существования должна проектироваться в той же мере, в какой проектируются жилище, одежда, машины и пр.

В основе конструирования пищи лежит комплекс исследований химических, физических, физико-химических, биохимических, технологических, медико-биологических и, как результат формализации, создание математических модели пищевых продуктов. Совершенно очевидно, что любая модель, сколь бы подробно она ни была, вряд ли способна полностью быть адекватной качеству. Аналогично любому математическому моделированию модель качества – всегда упрощение. В настоящее время возможно несколько принципиальных подходов к моделированию качества пищевых продуктов, хотя трудности, возникающие в этом направлении, достаточно большие.

Комбинированные продукты питания – это пища, получаемая из естественного сырья, которое проходит технологическую обработку, заключающуюся в выделении из сырья ценных (главным образом белковых) пищевых компонентов и придании им структуры, внешнего вида и вкуса, соответствующих привычному представлению потребителю о пищевых продуктах. Таким образом, различие между традиционной и комбинированной пищей сводится к различию в степени технологической обработки сырья. Сами пищевые компоненты при производстве пищи не синтезируются.

Создание комбинированных мясных продуктов – это максимальное использование сырьевых ресурсов как животных, так и растительных, а также максимальное приближение собственно пищи к идеальной, сбалансированной по всем показателям. Именно в этом направлении развивается новое для мясной промышленности производство детских и диетических продуктов, медико-биологические требования к которым сформулированы достаточно четко.

Совершенно бесспорным является влияние на производство пищевых продуктов, в том числе и мясопродуктов, фундаментальных достижений биологии, науки о питании. Практически до наших дней развитие технологии производства пищевых продуктов осуществлялось, опираясь фактически на твердую научную основу, сформированную в процессе длительной эволюции, - теорию сбалансированного питания. основополагающими принципами этой теории являются следующие положения: потребляемая пища должна обеспечивать поступление питательных веществ в количестве, компенсирующем их потерю в процессе жизнедеятельности организма, при этом должны поддерживаться оптимальные соотношения между многочисленными нутриентами, синтез которых не может быть осуществлен непосредственно в организме (незаменимые аминокислоты, жирные кислоты, некоторые моносахариды и др.).

До настоящего времени теория сбалансированного питания, являясь классической концепцией, определяла не только основные понятия биологической и пищевой ценности продуктов, но служила практическим руководством при выборе путей и способов переработки сельскохозяйственного сырья в готовые к употреблению пищевые продукты. Повсеместное господство классической концепции породило мнение о том, что поступающие с пищей белки, жиры, углеводы, минеральные вещества, витамины должны быть в возможно большей степени очищены от малоусваиваемых организмом так называемых балластных веществ; к тому же это еще улучшало органолептические свойства продуктов.

Широкое распространение рафинирования многих жизненно важных для организма пищевых продуктов постепенно привело к дефициту в питании человека грубоволокнистых балластных веществ, основу которых составляют пищевые волокна. В мясе и мясопродуктах их роль в определенной степени играют соединительнотканые образования. Недостаток пищевых волокон в пище приводит к серьезным нарушениям организма, болезням. В настоящее время сложилась необходимость включения малоусваиваемых компонентов в пищевую цепь.

## **1.1 Биохимические функции, свойства и состав крови**

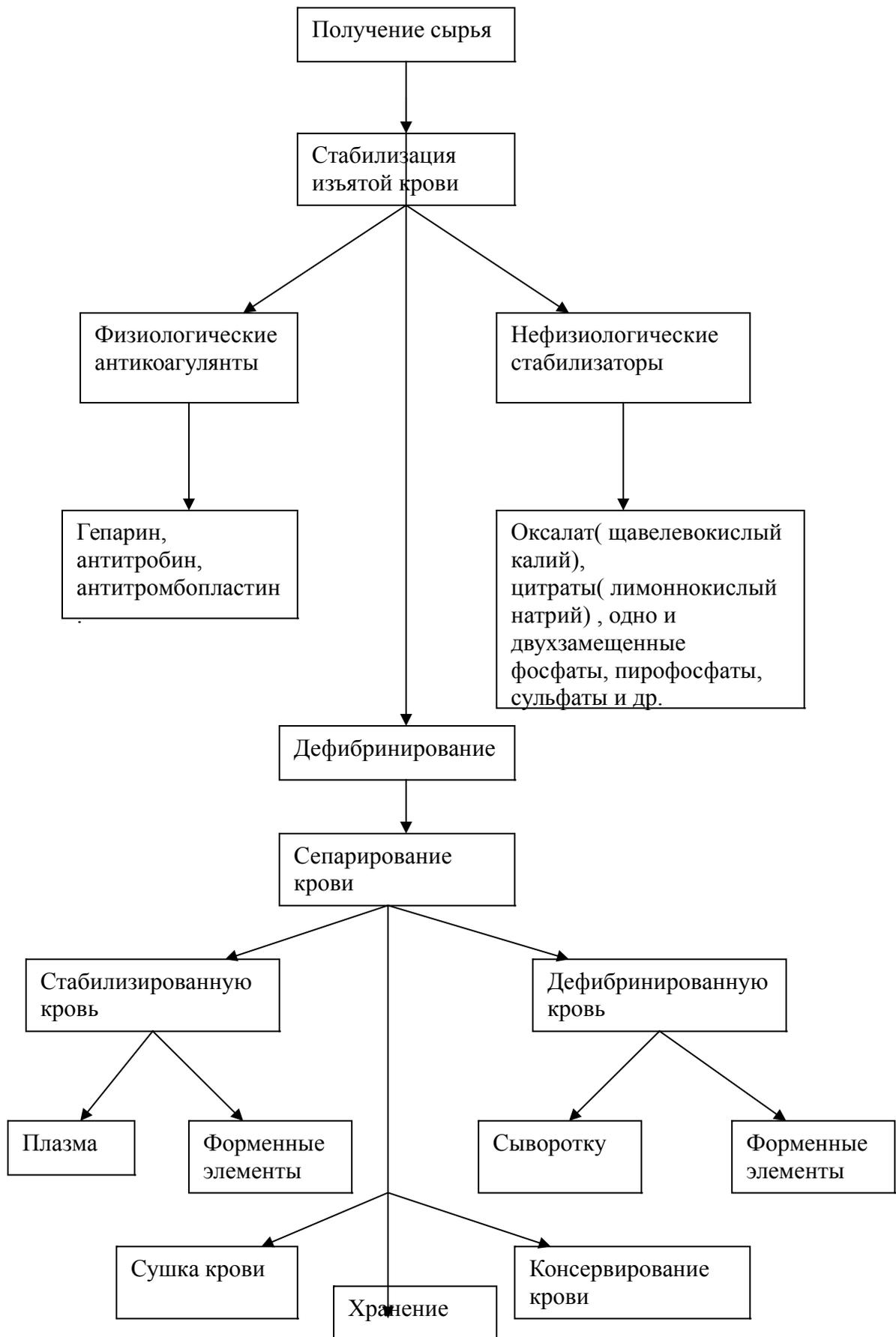
### **1.1 Переработка крови и требования к сырью**

Получаемая при убое сельскохозяйственных животных кровь является одним из важных источников белков, что делает ее ценным сырьем для производства пищевой, лечебной, кормовой и технической продукции. Полное использование крови способствует предотвращению загрязнения окружающей среды.

Количество и качество белков, входящих в состав крови, высокий уровень содержания железа в органически связанной форме предопределяет целесообразность более полного использования крови для производства мясопродуктов. В настоящее время при производстве колбас, полуфабрикатов и консервов широко применяют плазму и сыворотку крови. Цельную кровь и эритроциты используют при производстве кровяных колбас, отдельных видов зельцев, паштетов, консервов. В ограниченных количествах цельную кровь добавляют для улучшения окраски комбинированных мясопродуктов. Сочетание крови с другими белками, устраняющими дефицит изолейцина и метионина, а также применение специальных приемов обработки, маскирующих цвет и положительно влияющих на функциональные свойства системы, позволяют значительно повысить уровень использования крови при производстве различных видов мясопродуктов. Кровь используют при производстве лечебных препаратов: из крови и форменных элементов вырабатывают жидкий и сухой гематоген; из плазмы, сыворотки и фибрина изготавливают лечебные сыворотки и белковые гидролизаты. Из крови вырабатывают высокоценные белковые корма.

Для использования на пищевые цели и выработки лечебных препаратов пригодна кровь, собранная при соответствующих условиях, только от здоровых животных. Окончательное заключение о состоянии здоровья животных дается ветеринарно-санитарным надзором после тщательного осмотра туш, поэтому направление переработки крови окончательно определяют через 30 - 40 мин после оглушения животного.

При выработке кормовой и технической продукции используют кровь всех животных, допущенных к убою ветеринарно-санитарным надзором. Кровь, консервированная антисептиками, для кормовых целей непригодна. В схеме 1. показана переработка крови убойных животных.



### 1.1.1 Пищевая ценность крови

По биологической ценности среди белковых продуктов питания одно из первых мест принадлежит белкам крови, которые в большей мере, чем другие белки, обладают способностью восстанавливать белки плазмы и гемоглобина.

Цельная кровь убойных животных является сырьем для производства многих колбасных изделий, зельцев, консервов и других продуктов питания. Сыворотка крови также используется как полноценное белковое сырье. В качестве источника белков используют сухие продукты сыворотки крови, получившие название светлого альбумина.

По аминокислотному составу не все белки крови равноценны (см.табл.1).

Таблица 1 - Аминокислотный состав крови

Аминокислоты	Содержание незаменимых аминокислот, % к общему количеству их в белках крови			
	альбумины	глобулины	фибриноген	Гемоглобин
Валин	2,5	5,5	3,9	9,1
Гистидин	3,8	3,5	2,3	2,9
Лейцин	13,7	18,7	14,3	16,6
Изолейцин	2,9	18,7	5,0	-
Лизин	12,4	6,2	9,0	7,5
Метионин	1,3	1,0	2,6	1,6
Треонин	6,5	8,4	7,9	6,8
Триптофан	0,6	2,3	3,5	1,2
Фенилаланин	6,2	3,8	7,0	5,3
Аргинин	6,2	5,2	6,7	2,4

Плазма крови отличается от гемоглобина более высоким содержанием таких незаменимых аминокислот, как триптофан, метионин и изолейцин. В составе гемоглобина нет изолейцина. Вместе с тем в нем содержится много других незаменимых аминокислот, и поэтому в сочетании с другими белками крови его можно рассматривать как важный источник незаменимых аминокислот. Наиболее ценным белком по аминокислотному составу является фибриноген. В нем много триптофана, фенилаланина, метионина, лейцина. Таким образом, использование стабилизированной плазмы позволяет получать белковые продукты большой пищевой ценности. В тех случаях, когда продукты изготавливают из сыворотки или дефибринированной крови, важно использовать для пищевых целей остающийся фибрин.

Кровь убойных животных является источником многих витаминов. По содержанию витамина А она может быть использована и для лечебных целей. Содержание жира в крови невелико, но он тонко эмульгирован и хорошо усваивается, а фосфолипиды, сопутствующие нейтральным триглицеридам, способствуют лучшему усвоению пищи.

В результате технологической переработке компоненты крови претерпевают ряд превращений. При этом наибольшие качественные сдвиги связаны с превращениями белков. Важным является характер их денатурации. Различные фракции белков неодинаково устойчивы к воздействию повышенной температуры. Так, растворы фибриногена и глобулинов в 10% - ном хлористом

натрии свертываются соответственно при 52-55 и 75<sup>0</sup> С; раствор альбумина в 5% - ном хлористом натрии свертывается при 75<sup>0</sup> С, а в чистой воде при 50<sup>0</sup> С. скорость денатурации белков резко возрастает при сдвиге реакции в кислую сторону.

Высушивать кровь необходимо таким образом, чтобы белки можно меньше подвергались тепловой денатурации и не теряли способности растворяться. С этой целью используют распылительные сушилки, так как вследствие чрезвычайно малой величины жидкостных частичек тепловое воздействие на жидкую фазу в зоне распыления кратковременно.

### **1.1.2 Биохимические функции, свойства и состав крови**

Кровь убойных животных – один из важнейших источников высокого животного белка. По содержанию белка кровь практически не отличается от мяса и содержит лишь на 5-10% больше воды. Реакция среды слабощелочная, почти нейтральная. Кровь обладает способностью к пенообразованию и образованию эмульсий. Коэффициент переваримости крови составляет 94-96%., т.е. она почти полностью усваивается организмом. Кроме того, наличие в ней биологических активных веществ делает ее более полноценным источником продуктов питания.

Кровь (жидкая ткань животного организма) является внутренней средой организма, которая объединяет между собой органы и ткани и выполняет дыхательные, питательные, выделительные, регулярные и защитные функции. Она доставляет к органам и тканям питательные вещества, поступающие из внешней среды через пищеварительный тракт, и в нее выделяются из тканей различные продукты обмена. Артериальная кровь переносит кислород, необходимый для тканевого дыхания.

В кровь выделяются гормоны, т.е. она способствует гормональной регуляции. Кроме того, регулярные функции крови обуславливаются постоянным обогащением ее ферментами и другими биологически активными веществами. Регуляторные функции заключаются такие в поддержании постоянства осмотического давления, активной реакции среды и температуры тела.

Важнейшей функцией крови является транспортировка конечных продуктов тканевого обмена (например  $\text{CO}_2$ , мочевины, мочевой кислоты, аммонийных солей и других азотистых веществ, а также избытка минеральных солей) к органам выделения.

Кровь выполняет защитные функции организма, участвуя в борьбе организма с многими видами заболеваний. При попадании в кровь или ткани животного организма инородных высокомолекулярных веществ (белки или полисахариды), называемых антигенами, образуются антитела – белки, специфически реагирующие с исходными антигенами. Антитела вырабатываются плазматическими клетками, которые сходны с лимфоцитами и находятся в селезенке, лимфатических узлах, стенке пищеварительного тракта, печени и в других органах. Антитела способствуют агглютинации (лат. *agglutinare* – приклеивать) бактерий и связыванию антигенов.

Обнаруживают антитела по способности соединяться с исходным антигеном. Они исключительно специфичны и не реагируют даже с молекулами, сходными по строению с антигеном.

Защитные функции крови определяются также лейкоцитами, которые богаты протеолическими и липолитическими ферментами, способствующими быстрому распаду и перевариванию различных микробных тел при фагоцитозе.

#### **1.1.4 Морфологическая характеристика крови**

Кровь состоит из жидкой части - плазмы – и взвешенных в ней форменных элементов. К форменным элементам относятся:

- эритроциты (красные кровяные тельца) – специфические клетки крови, безъядерные у большинства животных или с ядрами, например, у птиц, амфибий, рептилий;

- лейкоциты (белые кровяные тельца) – лимфоциты, моноциты, нейтрофилы, эозинофилы и базофилы; в этих клетках имеются ядра, однако циркулирующие лейкоциты не делятся;

- тромбоциты (красные пластинки, бляшки) – продукты фрагментации (распада) особых гигантских клеток косного мозга – мегакариоцитов.

В крови разных видов животных содержание форменных элементов неодинаково. Количество их в среднем составляет у лошадей около 40% от массы крови.

Общее количество крови у различных видов животных также неодинаково. Так, у лошадей оно составляет 9,8% к массе лошади.

#### 1.1.4.1 Строение эритроцита.

Эритроциты по размерам и по концентрации в них основного белка – гемоглобина. Наиболее важной функцией эритроцитов является дыхательная. Они образуют громадную внутреннюю поверхность. При усиленном кровообращении общая поверхность эритроцитов, приходящая в соприкосновение с тканями, намного увеличивается, что обеспечивает быстрый перенос в теле животного газов и продуктов питания. Эритроциты непосредственно участвуют в транспортировке питательных веществ, адсорбируя их на своей поверхности. Оболочка эритроцитов, образованная уплотненной стромой, проницаема для воды, глюкозы, мочевины, анионов и способствует поддержанию определенного градиента концентраций различных катионов между плазмой и эритроцитами.

Основной составной частью эритроцитов является гемоглобин, количество которого колеблется от 30 до 41%. В одном эритроците может содержаться около 280 млн. молекул гемоглобина.

Гемоглобин в эритроцитах находится в трех состояниях: гемоглобин, связанный с белками стромы в достаточно прочный комплекс; гемоглобин, непрочно связанный с фосфатидами стромы; небольшая часть свободного гемоглобина. Для получения в необходимом количестве гемоглобина кровь, предварительно смешанную с антикоагулянтами (веществами, препятствующими свертыванию), центрифугируют для осаждения эритроцитов. После их очистки от примесей в изотоническом солевом растворе к ним добавляют дистиллированную воду, в результате чего они набухают и вскоре лопаются, а их содержимое переходит в окружающую среду. Оболочки эритроцитов и остатки клеток осаждают центрифугированием при высоких скоростях.

В строме, остающейся после удаления гемоглобина, содержится 70% белков и 25% липидов.

Среди белков стромы обнаружены нуклеопротеиды. Кроме того, в ней содержатся белки, бедные железом и серой, практически не расщепляемые пепсином и трипсином. В состав стромы входят также различные комплексы белков и липидов, свободные лецитины и кефалины, холестерин, его эфиры и нейтральные жиры. Азотистые небелковые вещества в качественном отношении во многом аналогичны азотистым веществам плазмы. Из минеральных веществ в эритроцитах преобладает калий, а из микроэлементов обнаружена медь, которая входит в состав сложного белка – купреина, а также цинк, являющийся составной частью сложного белка – фермента карбоангидразы. В эритроцитах найдено большое количество ферментов. Наиболее активны из них каталаза, карбоангидраза, специфическая ацетилхолинэстераза и др.

#### **1.1.4.2 Строение лейкоцита**

Химический состав лейкоцитов убойных животных изучен еще недостаточно. Из белков в лейкоцитах обнаружены параглобулины, нуклеопротеиды, цитоглобин и др. В лейкоцитах содержится значительное количество протеолитических и липолитических ферментов, а из углеводов – гликоген и некоторое количество сахара.

Лейкоциты как самостоятельная фракция при промышленной переработке крови пока не используются, но входят в состав препаратов, изготовляемых из форменных элементов.

#### **1.1.4.3 Строение тромбоцита**

Тромбоциты представляют собой весьма лабильные образования, которые при изъятии крови быстро разрушаются.

Разрушения тромбоцитов является начальным моментом свертывания крови, так как они содержат агенты, участвующие в этом процессе.

#### **1.1.4.4 Строение гемоглобина**

**Строение гемоглобина.** Гемоглобин является сложным белком, состоящим из белковой части глобина и простетической – гема. Молекулярная масса 68 000.

Молекула гемоглобина состоит из четырех субъединиц. Каждой субъединице гемоглобина соответствует индивидуальная полипептидная цепь, соединенная с гемом. На четыре субъединицы молекулы гемоглобина приходится две  $\alpha$ - и две  $\beta$ - цепи:  $\alpha$ - цепь содержит 141 аминокислотный остаток, а  $\beta$ - цепь – 146 аминокислотных остатков. Всего в глобине содержится 574 аминокислотные единицы. Спиральные отрезки цепей в гемоглобине составляют около 75% всей белковой молекулы, они соединены неспиральными участками различной длины. Дальнейшее усложнение молекулярной структуры возникает вследствие изгибов и свертывания спиралей в пространстве, в результате чего образуется причудливая форма третичной структуры каждой из полипептидных цепей (субъединиц). Взаимная плотная упаковка четырех субъединиц в пространстве образует четвертичную структуру молекулы гемоглобина. Отдельные субъединицы гемоглобина удерживаются вместе за счет электростатического взаимодействия, а также за счет образования некоторого числа водородных связей. Специфические свойства гемоглобина определяются его четвертичной структурой.

Гем является комплексным соединением протопорфирина IX и железа.

Железо в геме находится в центральном ядре и связано с азотами пирроловых колец двумя главными и двумя добавочными валентностями. Биосинтез гема осуществляется за счет ацетата и глицина. В опытах с ядерными эритроцитами было найдено, что четыре азота пирроловых колец происходят из аминогрупп глицина. Из 34 атомов углерода в молекуле гема восемь атомов происходят из  $\alpha$ - углеродов глицина, а остальные 26 – из углерода ацетата.

Гемоглобин выполняет роль дыхательного белка – переносчика кислорода. Концентрация его в крови разных животных неодинакова вследствие значительных различий в количестве эритроцитов и их величины.

От легких к тканям кислород переносится в основном в форме оксигемоглобина и только 0,5% его растворено в плазме. Кислородная емкость крови животных зависит от содержания в ней эритроцитов и гемоглобина.

Образование оксигемоглобина называется оксигенацией. Каждый из четырех атомов железа в молекуле гемоглобина способен соединиться с одной молекулой (т.е. двумя атомами) кислорода, однако железо при этом не окисляется. Реакция эта обратима: кислород поглощается, когда он находится в избытке (например, в легких) и освобождается там, где его меньше (в тканях). Молекула гемоглобина при оксигенации претерпевает конформационные изменения. Глобин обеспечивает физиологически наиболее выгодное взаимодействие атомов железа и гема с кислородом, благодаря чему молекула гемоглобина способна либо соединиться сразу с четырьмя молекулами кислорода, либо отщеплять их также все сразу; тем самым обеспечивается эффективное снабжение организма кислородом.

В переносе углекислоты от тканей к легким участвуют и эритроцитами, и плазма крови. Часть углекислоты, образующейся в тканях при окислительных

процессах, растворяется белками плазмы, большая же часть диффундирует в эритроциты, где взаимодействует с основаниями, образуя бикарбонаты.

В легочных капиллярах бикарбонаты разлагаются с выделением свободной  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , которая благодаря наличию карбоангидразы быстро диссоциирует на  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ .

Наряду с указанным, при переносе углекислоты от тканей к легким 15-20% ее может связываться глобином через свободные аминогруппы посредством карбаминовой связи с образованием карбогемоглобина.

Эти соединения нестойки и быстро диссоциируют в легочных капиллярах, выделяя  $\text{CO}_2$ .

**Специфичность гемоглобинов.** Видовые различия гемоглобинов, столь сходных по общей структуре и по своей функции, обусловлены различными сочетаниями аминокислот в молекуле глобина. Среднее число различий во всех полипептидных цепях гемоглобина лошади, свиньи, быка и кролика по сравнению с гемоглобином человека составляет около 22.

Получены многочисленные доказательства существования различных гемоглобинов у одного и того же вида. У человека и животных прежде всего различают нормальный гемоглобин, получивший название гемоглобина А (HbA) и эмбриональный гемоглобин (HbF), который заменяется на HbA вскоре после утробной жизни. В физиологических условиях сродство к кислороду у эмбрионального гемоглобина выше, чем у взрослого. Между этими формами гемоглобина имеются различия по аминокислотному составу и они проявляют неодинаковую абсорбцию в ультрафиолетовом свете.

Кроме нормального и эмбрионального гемоглобинов, у человека и животных обнаружены аномальные формы гемоглобинов. Так, у человека открыто свыше 30 аномальных форм, получивших соответственно название гемоглобинов S, C, D, E и др. HbS благодаря своей плохой растворимости легко выпадает в осадок, который обратимо изменяет двояковогнутую дисковидную форму эритроцита на заостренную, серповидную. Отсюда такой гемоглобин получил название серповидного. HbS обладает меньшим сродством к кислороду, что и обуславливает вызываемую им особую форму анемии. Серповидноклеточная анемия – это наследственное заболевание, причиной которого является мутация в одном из генов, участвующих в биосинтезе гемоглобина. Эта мутация выражается в замене глютаминовой кислоты в положении 6 на Валин в каждой из  $\beta$ -цепей. Различия в первичной структуре выявлены и для других аномальных гемоглобинов. Большинство из них обладает пониженным сродством к кислороду по сравнению с нормальным гемоглобином.

**Соединение гемоглобина с газами.** Гемоглобин способен легко соединяться не только с кислородом, но и с другими газами, не изменяя при этом валентности железа.

*Оксигемоглобин*  $\text{HbO}_2$  образуется в результате присоединения кислорода к гемоглобину. При этом меняются не только свойства простетической группы, но и физические и химические свойства глобина.

*Карбоксигемоглобин* ( $\text{HbCO}$ ) – более прочное (примерно в 200 раз) соединение, чем оксигемоглобин. Гемоглобин имеет большое сродство к  $\text{CO}$ .

Если в воздухе находится 1% CO, то 95% гемоглобина переходит в карбоксигемоглобин. Окись углерода легко вытесняет из оксигемоглобина кислород, поэтому при вдыхании CO большая часть гемоглобина крови переходит в HbCO, в результате чего нарушается процесс переноса кислорода от легких к тканям. В карбоксигемоглобине, как и в гемоглобине и оксигемоглобине, железо двухвалентное. Если в воздухе CO, карбоксигемоглобин разлагается с образованием гемоглобина. Поэтому вдыхание свежего чистого воздуха приводит к нормализации транспорта кислорода.

*Метгемоглобин* (HbOH) образуется при воздействии окислителей на гемоглобин. В его состав входит трехвалентное железо. Метгемоглобин может образоваться в животном организме при продолжительном вдыхании окислов азота, паров нитробензола, анилина и других окислителей. Он не способен соединяться с кислородом, поэтому при образовании метгемоглобина нарушается нормальное питание тканей. В животном организме метгемоглобин медленно восстанавливается в гемоглобин. Отмечено, что аскорбиновая кислота ускоряет этот процесс.

**Спектральные свойства гемоглобина и его производных.** Окраска гемоглобина и его производных различная: гемоглобин красного цвета, оксигемоглобин ярко-красный, метгемоглобин темно-красный, а карбоксигемоглобин – розового цвета. Каждое из этих соединений характеризуется присущей ему абсорбцией (поглощением) света. Поэтому если на пути луча между источником света и призмой спектроскопа помещен раствор какого-нибудь из этих соединений, то в результате избирательной абсорбции лучей определенной длины волны на спектре получатся неосвещенные, темные полосы. Такой спектр носит название спектра поглощения.

Раствор оксигемоглобина обладает резкой абсорбцией в видимой части спектра, обнаруживая две полосы поглощения, расположенные между фраунгоферовыми линиями *D* и *E*. Середина полосы поглощения, лежащей ближе к линии *D*, соответствует длине волны 576 нм и называется полосой  $\alpha$ . Вторая полоса, более широкая и с менее резкими краями, находится ближе к линии *E*, ее середина соответствует длине волны 540 нм. Эта полоса называется полосой  $\beta$ .

Между ними при длине волны 560 нм находится минимум поглощения.

При добавлении к оксигемоглобину восстанавливающих веществ спектр его изменяется и вместо двух полос поглощения появляется одна более широкая полоса. Середина ее соответствует длине волны 555 нм. Это спектр гемоглобина.

Спектр метгемоглобина представляет собой три полосы поглощения: две из них находятся между линиями *D* и *E*, а одна, наиболее резкая, соответствующая длине волны 630 нм, - между линиями *C* и *D*.

Спектр карбоксигемоглобина – две полосы поглощения при длине волны 572 и 537 нм между линиями *D* и *E* – очень сходен со спектром поглощения оксигемоглобина. Чтобы различить их, к растворам этих веществ добавляют раствор восстановителя. При этом в отличие от оксигемоглобина на спектре

карбоксигемоглобина не наблюдается никаких изменений, так как он не переходит в гемоглобин.

Сульфгемоглобины, гемохромогены и другие соединения, образующиеся в результате превращений гемоглобина, характеризуются различной окраской и специфическими спектрами поглощения.

По спектрометрическим данным, гемоглобин разных животных не различается. Если и существует очень незначительная разница в расположении полос поглощения, то она отчетливо не улавливается.

Спектрометрический анализ гемоглобина и его производных имеет важное практическое значение, так как позволяет быстро устанавливать превращения гемпротеина.

**Физико-химические свойства гемоглобина и гема.** Различные виды гемоглобинов отличаются по растворимости. Растворимость их убывает в следующей последовательности: гемоглобин человека, затем быка, свиньи, лошади.

Способность к кристаллизации проявляется в обратном порядке.

Гем является нестойким соединением. Отщепляясь от глобина, он легко окисляется с образованием гемина – комплекса порфирина с трехвалентным железом (феррипротопорфирин). При обработке растворов гемоглобина разведенными минеральными кислотами или щелочами выделяется окисленная форма гема – гематин (гидроокись феррипротопорфирина). При воздействии на растворы гемоглобина концентрирование уксусной кислоты в присутствии NaCl гем окисляется и выделяется в виде хлоргемина.

Обработка растворов гемоглобина концентрированной серной кислотой приводит к образованию гематопорфирина – соединения тетрапирроловой структуры.

При денатурации глобина, даже частичной, увеличивается чувствительность гема к окислению.

При восстановлении гематина, например сернистым аммонием в присутствии денатурированного глобина, образуется гемохромоген – соединение денатурированного глобина с гемом.

В результате нагревания оксигемоглобина отщепляется гематин, образующий с органическими основаниями бурные парагематины.

Нативный глобин можно получить при осторожном прибавлении к раствору гемоглобина соляной или щавелевой кислоты. Отщепляющийся при этом гемин извлекают диэтиловым эфиром, а глобин осаждается в избытке ацетона или осаждением NaCl. Глобин сравнительно легко подвергается денатурации и диссоциации на составляющие полипептидные цепи.

### 1.1.5 Химический состав и физико – химические свойства крови.

Химический состав крови у животных одного вида в норме постоянен, а у животных разных видов имеются некоторые колебания в содержании компонентов.

Таб.2. Химический состав крови.

Состав крови	Содержание составных частей
--------------	-----------------------------

	(в г) в 1000 г цельной крови лошади
Вода	749,02
Сухой остаток	250,98
В том числе:	
гемоглобин	166,9
другие белки	69
сахар	0,526
холестерин	0,346
лецитин	2,913
жир	0,611
жирные кислоты	-
натрий	2,691
калий	0,758
окись железа	0,828
кальций	0,051
магний	0,064
хлор	2,785

Кровь является средой, в которую поступают различные продукты тканевого обмена, кислород, а также питательные вещества. Несмотря на это, кровь большого круга кровообращения характеризуется довольно постоянным составом. Такое динамическое постоянство поддерживается различными механизмами, регулирующими поступление в кровь продуктов питания и выделение из нее продуктов обмена. Благодаря постоянному составу плазмы крови создаются неизменные условия среды, необходимые для существования клеток.

Осмотическое давление крови животных обуславливается в основном содержанием в ней неорганических веществ (их молекул и ионов), а также частично белками плазмы и другими органическими соединениями. Осмотически наиболее активными веществами являются соли NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, KCl, при диссоциации которых образуются ионы, ведущие себя как осмотически активные частицы. Постоянство осмотического давления крови обеспечивается деятельностью регуляторных механизмов, способствующих выделению из организма избытка как воды, так и осмотически активных веществ.

Осмотическое давление выражают величиной депрессии ( $\Delta$ ), характеризующей температуру понижения замерзания крови по сравнению с температурой замерзания чистой воды. Депрессия крови убойных животных составляет: лошадей 0,558, коровы 0,611, овцы и свиньи 0,618, кролика 0,595.

Ряд жизненных функций клеток, в частности сохранение ими определенной формы, способность воспринимать извне и отдавать во внешнюю среду вещества, зависит от осмотического давления клеточного сока и омывающей клетки жидкости, т. е. лимфы и связанной с ней плазмы крови.

Осмотическое давление белков плазмы и других коллоидов называется коллоидно-осмотическим, или онкотическим, давлением. Оно примерно составляет около 0,004-0,006 общей величины осмотического давления крови.

Осмотическая (онкотическая) активность белков плазмы неодинакова. Например, сывороточные альбумины обуславливают  $\frac{3}{4}$  осмотического давления, создаваемого белками, хотя по количеству составляют приблизительно  $\frac{1}{2}$  всех белков плазмы. Сравнительно высокая осмотическая активность сывороточных альбуминов является следствием большей их концентрации (в результате меньшей величины молекул) по сравнению с другими белками плазмы.

Распределение воды между тканями и кровью при одинаковой концентрации в них солей определяется концентрацией белков в плазме. Если в кровь вводится большое количество физиологического раствора, изотоничного плазме, то концентрация сывороточных белков в крови резко снижается. При этом онкотическое давление в плазме уменьшается, что создает предпосылки для перехода воды из крови в ткань, поскольку осмотическое давление белков в тканевой жидкости остается прежним.

Для крови животных характерно также относительное постоянство концентрации ионов водорода (рН). Реакция крови убойных животных слабощелочная и колеблется обычно в небольших пределах. ( см.таблица № 2 )

Таблица № 3

Кровь	рН
Коровы	7,36-7,50
Овцы	7,40-7,58
Лошади	7,20-1,60
Козы	7,65
Свиньи	7,85-7,95

Изменение рН крови может быть вызвано рядом причин. В продуктах переваривания, поступающих в кровь, имеются различные кислоты и основания. Кроме того, в продуктах внутриклеточного обмена, поступающих вначале в тканевую жидкость, а затем в кровь, также содержится значительное количество кислот и оснований. Прижизненный сдвиг рН крови в кислую сторону называется ацидозом, в щелочную – алкалозом. Компенсированный сдвиг кислотно-щелочных отношений в сторону алкалоза характерен для травоядных животных, в сторону ацидоза – для плотоядных. (см. таблица №4 )

Таблица №4

Буферные системы	Плазма	Эритроциты
Бикарбонатная	$\frac{H_2CO_3}{NaHCO_3}$	$\frac{H_2CO_3}{KH CO_3}$
Фосфатная	$\frac{NaH_2PO_4}{Na_2HPO_4}$	$\frac{KH_2 PO_4}{K_2 HPO_4}$
Белковая (плазмы)	$\frac{H - белок}{Na - белок}$	-
Гемоглобиновая	-	$\frac{H(Hb)}$

Оксигемоглобиновая	-	$K(Hb)$ $\frac{H(Hb)O_2}{K(Hb)O_2}$
--------------------	---	--

Постоянство активной реакции среды обусловлено наличием в крови буферных систем и непрерывным освобождением ее от конечных продуктов обмена путем экскреции. Главные буферные системы крови приведены в табл. Буферные системы крови отличаются высокой кислотной емкостью. Температура замерзания и электропроводность крови постоянны, что обусловлено в основном постоянным количеством электролитов. Минеральных веществ содержится около 0,9%.

### 1.1.6 Плазма крови.

В плазме крови содержится 90 - 91% воды и 9 – 10% плотного остатка. Большую часть плотного остатка составляют белки, а остальную часть – азотистые и безазотистые экстрактивные вещества (см. таб.5).

Таблица 5. Химический состав плазмы крови.

Состав плазмы	Содержание составных частей
---------------	-----------------------------

	(в г) в 1000 г плазмы лошади
Вода	902,05
Сухой остаток	97,95
В том числе:	
белки	84,24
сахар	1,176
холестерин	0,298
лецитин	1,720
жир	1,300
жирные кислоты	-
натрий	4,434
калий	0,263
кальций	0,1113
магний	0,045
хлор	3,73
общий фосфор	0,240
в том числе неорганический фосфор	0,071

Плазма крови ( жидкое межклеточное вещество) богата белками ( альбумином, глобулином, фибриногеном), содержит железо. Оставшуюся после выпадения фибрина часть плазмы называется сывороткой ( идет на производство различных биопрепаратов).

Интерес к плазме крови животных как к объекту перерабатывающей промышленности также связан с ее составом, биологическими функциями и физико – химическими свойствами. В плазме крови содержится около 7,5- 8,0 % белка, 1,1 % других органических соединений, а остальные составляют минеральные соли. В состав плазмы крови входят ферменты, гормоны, биологически активные амины, из которых выполняют свою специфическую функцию, характеризуется индивидуальными свойствами и строением.

### **1.1.7 Биохимические и физико-химические свойства белков плазмы**

Основными фракциями белков плазмы крови являются сывороточные альбумины, сывороточные глобулины и фибриноген. Альбумины и глобулины активно участвуют в обмене веществ, быстро расходуются на нужды организма и так же быстро восстанавливаются.

Фибриноген является главным компонентом системы свертывания крови. Он не растворим в воде, но хорошо растворяется в разбавленных растворах нейтральных солей и в щелочах, осаждается сернокислым магнием и хлористым натрием ранее, чем наступает полное насыщение.

Фибриноген – белок с молекулярной массой 330 000. Молекулы фибриногена состоят из трех глобулярных структур с диаметром около  $6 \cdot 10^{-9}$  м, соединенных между собой более тонкими белковыми тяжами.

Молекула фибриногена построена из шести полипептидных цепей, соединенных дисульфидными связями – двух А- и двух В- цепей, несущих у разных животных в качестве N-концевых групп различные кислотные остатки и двух С-цепей – с тирозильными остатками на N-конце.

**Сывороточные альбумины.** Эти белки у различных убойных животных сходны по своим биологическим и физико-химическим свойствам. Сывороточные альбумины, образуемые в печени, поддерживают коллоидно-осмотическое (онкотическое) давление крови. При физиологических значениях рН они заряжены отрицательно, а молекулы их близки по размерам.

Внутренняя вязкость сывороточных альбуминов сравнительно невелика, что существенно для кровообращения, так как при этом уменьшается работа, выполняемая сердцем. Сывороточные альбумины выполняют ответственную роль в переносе метаболитов. Они связываются с углеводами, липидами и другими соединениями. Альбумины – непосредственно акцепторы жирных кислот. Они переносят липиды от жировых депо к местам потребления. Очень велика роль сывороточных альбуминов в переносе углеводов, с которыми они образуют различные глюкопротеиды. Очень легко возникают комплексы сывороточных альбуминов с различными катионами и анионами, а также с многочисленными продуктами обмена. Наиболее важными являются питательные функции сывороточных альбуминов. В некоторых случаях при очень интенсивном обмене они могут быть единственным источником белкового питания тканей. Альбумины выполняют важную роль в транспортировке и регуляции активности гормонов.

По физико-химическим свойствам сывороточные альбумины являются типичными альбуминами: они растворяются в воде и солевых растворах средней концентрации, причем растворимость их во многих растворителях выше растворимости большинства других компонентов плазмы. В связи с этим методы их выделения основаны на осаждении других компонентов, тогда как альбумины остаются в растворе. Но ввиду того, что сывороточные альбумины легко взаимодействуют с другими белками, а также могут быть связаны с липидами и углеводами, растворимость их в естественных системах может отличаться от растворимости в изолированном состоянии.

Очищенный сывороточный альбумин остается гетерогенным, что показано при помощи электрофореза, хроматографии и иммунохимических методов.

Способность сывороточного альбумина легко вступать в реакцию с целым рядом веществ обусловлена наличием в его молекуле 55 ε -аминогрупп лизина, высокоактивных тиоловых и имидозольных групп, большого количества

карбоксильных групп (активность последних при физиологических значениях рН относительно невелика).

**Сывороточные глобулины.** Эти белки представляют собой смесь компонентов, обозначаемых как  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -глобулины. При электрофорезе они разделяются на фракции (в порядке уменьшения подвижности):  $\alpha_1$ - и  $\alpha_2$ -глобулины,  $\beta_1$ - и  $\beta_2$ -глобулины и  $\gamma_1$ - и  $\gamma_2$ -глобулины.

Сывороточные глобулины также участвуют в переносе различных веществ. Например,  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобулины связывают в сложные биоконплексы такие важные соединения, как углеводы, холестерин, фосфолипиды, витамины, гормоны (тироксин, эстрон, тестостерон и др.) и различные ионы.

Во фракцию глобулинов входят антитела. Большинство антител представляют собой  $\gamma$ -глобулины. Долгое время антитела рассматривали как особый класс  $\gamma$ -глобулинов, отличающихся от тех  $\gamma$ -глобулинов, которые лишены соответствующих свойств. Показано, что антитела очень сходны по свойствам со всеми  $\gamma$ -глобулинами и эти антитела называют иммуноглобулинами.

В плазме крови содержится комплемент, представляющий собой комплекс многочисленных факторов: один из них термостабилен, другие термолабильны. Символом  $C'$  принято обозначать весь этот комплекс в целом. Комплемент вызывает лизис сенсibilизированных эритроцитов и клеток бактерий. Первый компонент комплемента  $C'_1$  является ферментом со специфичностью, близкой к трипсину. Четвертый компонент комплемента  $C'_4$  представляет собой глюкопротеид. О свойствах и функциях остальных компонентов известно еще немного; все они необходимы для выполнения указанных выше функций. Компоненты комплемента принимают участие в реакции взаимодействия антител с антигенами.

**Пропердин** (perdere – разрушать). Это сложный белковый комплекс, состоящий из молекул  $\gamma$ - и  $\beta$ -глобулинов и частиц углеводов. Он входит в пропердиновую систему веществ сыворотки, состоящую из комплемента, пропердина и ионов магния. Эта система обеспечивает резистентность животного организма к инфекциям, так как способна лизировать некоторые бактерии и инактивировать некоторые вирусы.

Отсутствие пропердина в сыворотке новорожденных (т.е. безмикробных) животных и его появление после контакта с бактериальной флорой среды служит подтверждением того, что данное активное вещество имеет природу антител.

**Сложные белки и белковые комплексы плазмы крови.** Физиологическое значение комплексов белков и белков с веществами небелковой природы плазмы крови связано с ее транспортными функциями. Кроме того, комплексы белков с веществами небелковой природы имеют большое значение для регуляции проницаемости их, обезвреживания некоторых токсических веществ (например, связывание билирубина, соединение тяжелых металлов с сывороточным альбумином), изменения активности ионов и т.п.

**Липопротеиды.** Липиды в основном связываются с  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобулинами. Большинство липопротеидов, особенно холестерин-белковые комплексы отличаются лабильными связями. Наряду с этим существуют

липопротеиды, являющиеся вполне определенными химическими соединениями. Функции липопротеидов не ограничены только их транспортной ролью. Например  $\beta$  - глобулин, содержащий липиды, является антиоксидантом. Липопротеиды принимают участие в реакциях иммунитета. Липопротеидную природу имеют и некоторые компоненты свертывания крови.

*Гликопротеиды.* Одна часть гликопротеидов при фракционировании выделяется с альбуминовой фракцией. Другая часть гликопротеидов образуется в результате соединения углеводов с  $\alpha$  - и  $\beta$  - глобулинами.

Некоторые сложные белки плазмы и сыворотки крови имеют смешанный состав (например, гликопротеиды).

*Металлосодержащие белки.* В глобулиновой фракции белков обнаружены  $\beta$  -глобулины, в состав которых входят медь и железо.

Железосодержащий белок – трансферрин – выполняет функции переноса железа, которое используется при синтезе гемпротеинов (гемоглобин и миоглобин) и железопорфириновых ферментов. Молекулярная масса трансферрина 90 000. Каждая молекула его способна присоединять два атома железа.

Медьсодержащий белок, выделенный из плазмы крови, получил название гемокупреина, или церулоплазмина. В нем содержится 0,34 % меди. Молекулярная масса его 150 000. Очевидно, этот белок выполняет функции переноса меди.

### 1.1.8 Ферменты плазмы

В плазме крови постоянно присутствуют так называемые эндоферменты – церулоплазмин, псевдохоллинэстераза, липаза, специфические протеиназы и пептидазы, каталаза, пероксидаза, а также ферменты и коферменты свертывающей и противосвертывающей систем крови. Эндоферменты выполняют регуляторные функции в процессах липидного обмена, свертывания крови и окисления.

Экзоферменты плазмы – ферменты, поступающие в кровеносное русло в результате тканевого распада или нарушения проницаемости мембран. Эти ферменты обладают определенной тканевой специфичностью и поэтому представляют большой интерес для диагностики заболеваний.

В число своеобразных протеиназ плазмы входит фермент системы свертывания крови – тромбин, образующийся из протромбина, который, синтезируясь в печени, поступает в кровь. Синтез протромбина подавляется при недостаточности витамина К. Образование тромбина из протромбина представляет собой серию реакций «ограниченного протеолиза». Активный тромбин хорошо расщепляет пептидные связи аргинин – глицин в процессе превращения фибриногена в фибрин.

Своеобразной протеиназой плазмы также является плазмин (фибринолизин), образующийся из пламиногена, который, синтезируясь по крайней мере частично в клетках (эозинофилах) костного мозга, поступает в кровь и другие ткани. Активаторы пламиногена представляют собой протеолитические ферменты, способные гидролизовать пептидные связи основных аминокислот. В отличие от тромбина и других протеиназ плазмин может гидролизовать широкий спектр различных белков плазмы. Обладая высокой гидролитической активностью к фибрину и фибриногену, он является одним из основных компонентов противосвертывающей системы. Действие плазмина связано с процессом фибринолиза, т. е. с процессом лизиса сгустков фибрина.

В плазме крови содержатся протеолитические ферменты – калликреины, освобождающие гипотензивные пептиды (кинины) при действии на белки плазмы крови, а также ферменты, осуществляющие последующую деградацию кининов. При действии на  $\alpha$ -глобулин плазмы (кининоген) калликреин освобождает нонапептид брадикинин, обладающий способностью снижать кровяное давление, вызывать сокращение гладкой мускулатуры и оказывать другие физиологические воздействия. Кининоген бычьей плазмы является  $\alpha$ -гликопротеидом с изоэлектрической точкой при рН 3,3-3,6, с подвижностью  $\alpha$ -глобулина и молекулярной массой 50 000. Калликреин образуется в результате ограниченного протеолиза из калликреиногена, который, подобно большинству других белков плазмы, синтезируется в печени. В плазме крови содержится карбоксипептидаза N, вызывающая инактивацию брадикинина и каллидина (кинин, образующийся при воздействии панкреатического калликреанина на глобулин плазмы) в результате отщепления C-концевого остатка аргинина.

### **1.1.9 Выделение и методы фракционирования белков плазмы**

При исследованиях, а также при производстве препаратов часто возникает необходимость, выделить из плазмы крови отдельные белковые фракции. Основными методами их фракционирования являются дробное осаждение с применением спирто-водных растворителей, разделение в электрофоретических приборах.

Метод дробного высаливания белков нейтральными солями нашел широкое применение благодаря своей простоте и доступности. Однако для

получения большого количества белковых фракций он непригоден, так как на удаление солей путем диализа с применением антисептиков требуется много времени.

Разделение белков плазмы с применением в качестве осадителя этилового спирта во избежание денатурации производят при низкой температуре. Спирт затем легко удаляют путем диализа или при высушивании белков в замороженном состоянии под вакуумом.

Метод фракционирования белков с применением спирто-водных растворителей основан на растворимости белков в зависимости от ряда факторов: ионной силы (обуславливает силы взаимного притяжения и отталкивания и зависит от концентрации и валентности анионов и катионов соли), диэлектрической проницаемости, или диэлектрической постоянной (влияет на растворимость белков и диссоциацию солей в растворе), температуры (понижение температуры способствует уменьшению растворимости белков, что используется при осаждении), концентрации водородных ионов (влияет на растворимость белков – плохая растворимость белка в изоэлектрической точке используется для осаждения при фракционировании), концентрации белка (для наиболее полного осаждения существует оптимальная концентрация белка). Изменяя эти условия, выделяют из сыворотки крови отдельные белковые фракции.

Так, например, при обработке плазмы охлажденным (до 0°C) 8-10% - ным этанолом осаждаются преимущественно фибриноген. Осаждение  $\gamma$ - и  $\beta$ -глобулинов происходит при повышении концентрации этанола до 25 % (при -5°C). Белки, растворимые в 20 %-ном этаноле, состоят из  $\beta_1$ - глобулинов, а в осадке содержатся  $\gamma$ - глобулины, протромбин и другие протеолитические ферменты.  $\beta$ - Глобулины нерастворимы в 17 %-ном этаноле при рН 5,2, тогда как  $\gamma$ - глобулины остаются в этих условиях в растворе и осаждаются при увеличении ионной силы до 0,05. осадок содержит большую часть антител.

После осаждения  $\gamma$ - и  $\beta$ - глобулинов из надосадочной жидкости осаждаются  $\alpha$ - глобулин путем понижения концентрации этанола до 18% и доведения рН до 5,2. Повышая затем концентрацию этанола до 40% и доводя рН до 4,8, получают осадок альбуминов.

Для разделения белков сыворотки крови широко используется зонный электрофорез. Выбор носителя для зонного электрофореза зависит главным образом от поставленной задачи. Если основной целью является разделение компонентов, то в качестве носителей используется крахмал или полиакриламидный гель. Для получения препаратов чистого белка используют крахмальный блок или колонну, внося большие количества материала.

Для очистки белковых препаратов из сыворотки крови используют ионообменные колонки. Для этих целей обычно применяют ДЭАЭ-целлюлозу (анионообменник, образующийся в результате присоединения к целлюлозе диэтиламиноэтильных групп) и КМ-целлюлозу (катионообменник, образующийся в результате присоединения к целлюлозе карбоксиметильных групп). Пропуская через колонку белковые смеси, а затем буферные растворы с возрастающей ионной силой или же растворы с возрастающей (или убывающей) величиной рН, получают чистые препараты.

Избирательное адсорбирование отдельных белков такими носителями, как гель фосфата кальция, алюмогель, целит, крахмал и гидроксилпатит, и последующая их избирательная элюция используется для очистки белков при получении препаратов из сыворотки крови. Такое фракционирование может производиться как на колонках, так и на пластинках адсорбента.

Для получения чистых препаратов из сыворотки крови используют также молекулярную фильтрацию. Широкое распространение получили сефадексы – полимеры в виде гранул, построенных из нитевидных молекул полисахарида декстрана, сшитых через определенные промежутки поперечными связями. Молекулярные сита с диэтиламиноэтильными и карбоксиметильными группами позволяют одновременно фракционировать смеси как по размерам частиц, так и по их заряду.

### 1.1.10 Небелковые компоненты плазмы

**Углеводы плазмы.** В плазме крови животных всегда содержатся моносахариды, в основном глюкоза и фруктоза.

Кроме того, в плазме имеется небольшое количество комплексно связанных полисахаридов, а также продукты промежуточного обмена углеводов: молочная, пирогривная,  $\alpha$ -кетоглутаровая, янтарная и другие кислоты. Количество этих продуктов, особенно молочной кислоты, в плазме крови разных животных неодинаково. Так, в плазме крови лошади содержится 18,1 мг %, быка и барана 11,2 мг %, свиньи 43,1 мг % молочной кислоты. В результате напряженной мышечной работы повышается распад гликогена, что

ведет к увеличению содержания молочной кислоты, количество которой в плазме крови может достигать 150 мг %. Так, в плазме крови лошади содержится 18,1 мг % молочной кислоты.

**Липиды плазмы.** В плазме обычно содержатся нейтральные жиры и продукты их распада (глицерин и жирные кислоты), а также лецитины, кефалины и их комплексы с сывороточными альбуминами и глобулинами. Свободного холестерина и его эфиров в плазме крови животных значительно меньше, чем холестерина, связанного в холестерин-белковые комплексы. В качестве белкового компонента в этих комплексах чаще встречаются глобулины и реже альбумины.

**Азотистые и безазотистые низкомолекулярные вещества плазмы.** В плазме крови всегда содержатся азотсодержащие экстрактивные вещества, среди которых имеются как промежуточные (пуриновые основания, аминокислоты, полипептиды), так и конечные продукты азотистого обмена (мочевина, мочевая кислота, аллантоин, креатинин, аммонийные соли, гиппуровая кислота, билирубин и другие соединения). Азот всех небелковых веществ плазмы крови называется остаточным азотом. Количество его в плазме крови обусловлено интенсивностью белкового обмена (при отсутствии патологических явлений, когда определяющее значение имеет функция почек) и колеблется от 20 до 60 мг %. Содержание остаточного азота в крови у лошади – 30-58 мг %.

Содержание остаточного азота может служить показателем свежести крови и продуктов крови при их хранении и переработке; увеличение остаточного азота свидетельствует о гнилостном распаде белков.

**Витамины крови.** Кровь транспортирует к тканям витамины, поступающие с пищей. В крови убойных животных в значительном количестве содержатся тиамин, рибофлавин, аскорбиновая кислота, витамин А и каротины, биотин, ниацин, пантотен, цианокобаламин, а также витамины D, E, K.

**Минеральные вещества плазмы.** Из минеральных веществ в крови находятся соли, всасываемые через кишечник, а также соли, подлежащие выведению из организма. В среднем в крови животных содержится примерно 0,9% минеральных веществ, что соответствует ионной силе 0,15. У разных животных минеральный состав крови неодинаков, а у одного и того же животного характеризуется известным постоянством, значительные отклонения от него наблюдаются только при заболеваниях.

К минеральным соединениям плазмы крови относятся NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, CaCO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> и др. В ней содержатся также в небольшом количестве соединения железа, йода, меди, цинка, кобальта и других элементов. Минеральные соединения находятся в крови в ионизированном состоянии, в виде молекулярно-дисперсных систем, биохимических комплексов с белками и т.п.

**Пигменты плазмы.** Кровь интенсивно окрашена в красный цвет, что в основном обусловлено содержанием гемоглобина в эритроцитах крови. Окраска плазмы крови зависит от содержания пигментов: билирубина, биливердина, уробилина, липохромов и лютеинов.

Биливердин (зеленая окраска) и билирубин (золотисто-желтая окраска) являются продуктами распада гемма. В плазме крови их содержится около 0,2 – 0,5 мг %. Уробилин – продукт окисления билирубина.

На окраску сыворотки влияет количество липохромов и лютеинов. Липохромы – сборное название пигментов, принадлежащих к группе каротиноидов. Лютеины – растительные пигменты (каротины и ксантофиллы). Эти пигменты поступают в организм животного с пищей.

### 1.1.12 Форменные элементы

Размеры и количество форменных элементов в крови лошади: (см. таб. 6.)  
Таблица 6. Количества форменных элементов.

Эритроциты		Лейкоциты		Тромбоциты	
Диаметр, мкм	Количество в 1мм <sup>3</sup> , млн.	Диаметр, мкм	Количество в 1мм <sup>3</sup> , тыс.	Диаметр, мкм	Количество в 1мм <sup>3</sup> , тыс.
5,6	8-10	от 4 до 20	8-11	2-3	от 200 до

					600
--	--	--	--	--	-----

При выдерживании крови в спокойном состоянии и добавлении к ней противосвертывающих веществ форменные элементы постепенно осаждаются. Первыми оседают эритроциты (как наиболее тяжелые), образуя нижний слой, окрашенный в интенсивно красный цвет. Над ними скапливаются лейкоциты в виде серовато-белого слоя.

В производственных условиях форменные элементы отделяют от плазмы сепарированием.

Общий химический состав форменных элементов крови убойных животных приведен в табл. 7

Таблица 7. Химический состав форменных элементов.

Состав форменных элементов	Суммарное содержание составных частей (в г) в 1000 г форменных элементов лошадей
Вода	618,15
Сухой остаток	381,85
В том числе:	
гемоглобин	315,08
другие белки	56,78
холестерин	0,388
лецитин	3,973
жирные кислоты	-
натрий	-
калий	4,935
окись железа	1,563
магний	0,0209
хлор	1,949
общий фосфор	1,901
неорганический фосфор	1,48

## 1.2 Биохимические превращения изъятой крови.

### Процесс свертывания

После изъятия из кровеносных сосудов кровь через несколько минут свертывается. При этом образуется сгусток из сетки нитей фибрина, заполненной форменными элементами и сывороткой. Через определенный промежуток времени начинается ретракция сгустка: нити фибрина укорачиваются, сгусток уменьшается в объеме, из него выжимается сыворотка.

Способность крови свертываться при травме кровеносных сосудов является одним из важных защитных приспособлений животного организма.

При жизни животного в большом круге кровообращения кровь не свертывается благодаря наличию в ней физиологических антикоагулянтов. Кроме того, для предотвращения тотальной закупорки кровеносных сосудов тромбами имеется биохимический механизм их разрушения – фибринолиз при воздействии активного фермента – пламина.

Скорость свертывания крови различных животных неодинакова: кровь лошадей свертывается через 11,5-15 мин, крупного рогатого скота – через 6,5-10 мин, свиней – через 3,5-5 мин, овец – через 4-8 мин, а скорость свертывания крови домашних птиц менее 1 минуты. Различная скорость свертывания крови обуславливается разной концентрацией естественных антикоагулянтов в плазме крови животных. Немаловажную роль играют и видовые различия в концентрации фибриногена.

Образование фибриновой основы сгустка – заключительный этап свертывания крови, которому предшествует ряд превращений, связанных с взаимодействием многих компонентов крови ферментативной и неферментативной природы. Реакции, протекающие при свертывании крови, находятся в тесной взаимосвязи, причем для осуществления каждой последующей реакции необходимо, чтобы произошли все предыдущие.

Все вещества, участвующие в процессе свертывания крови, кроме кальция (фактор IV), являются белками.

### **1.2.1 Основные свойства компонентов свертывания**

**Фибриноген.** Содержание этого белка в крови разных животных неодинаково. Фибриногены лошади, быка, овцы и свиньи характеризуются слабой видовой специфичностью, но резко отличаются иммунологически от фибриногена птиц. Образование специфического фибринового сгустка свойственно только нативному фибриногену. Денатурация лишает фибриноген этой способности.

**Фибрин.** Первые стадии полимеризации фибрин-мономеров обратимы; после образования гептамеров или октамеров процесс становится необратимым. Фибрин, образованный в присутствии активной трансглутаминазы и ионов кальция, более устойчив к действию плазмина, чем растворимый фибрин.

**Протромбин.** Предшественник тромбина. Биосинтез его осуществляется с участием витамина К в печени, откуда он и поступает в крови. Протромбин, являясь глюкотеидом, при фракционировании выделяется с фракцией глобулинов плазмы. Основная часть его обнаруживается во фракции  $\alpha_2$ -глобулинов. Содержание протромбина в крови различных животных неодинаково. Протромбин может связываться некоторыми адсорбентами. Это используется для его выделения и количественного определения.

**Тромбин.** В циркулирующей крови здоровых животных тромбин не обнаружен. Появляется он при свертывании крови. Температурный оптимум действия тромбина 35-40°C. С понижением температуры активность его снижается, а при 0°C вовсе не проявляется, хотя фермент не разрушается.

**Тромбопластин** (тромбокиназа). Выделяется при разрушении тромбоцитов. Образование активного тромбопластина значительно ускоряется в присутствии тромбина. Тромбопластин представляет собой лабильный, очень сложный липопротеидный комплекс, состоящий из белка, рибонуклеиновой кислоты и ацетальфосфатидов. Тромбопластин легко расщепляется, теряя активность при удалении фосфатида.

**Антигемофильный глобулин.** Обнаружен во фракции  $\beta_2$  – глобулинов. В процессе свертывания крови он почти полностью используется и поэтому в сыворотке не обнаруживается. Антигемофильный глобулин очень лабилен, его можно получить из стабилизированной плазмы. Препараты хранят при отрицательных температурах.

**Проконвертин и конвертин.** Активный конвертин образуется при взаимодействии своего предшественника проконвертина с тромбопластином с участием ионов кальция. Проконвертин синтезируется в печени при участии витамина К. В сыворотке крови крупного рогатого скота и других животных проконвертин содержится в относительно больших количествах, поэтому она является хорошим источником для его выделения. Выделенный проконвертин стабилен при хранении.

### 1.2.2 Стабилизация крови

Для предотвращения или замедления свертывания кровь стабилизируют, для чего исключают или нарушают активацию одного из компонентов системы свертывания крови. Роль ингибиторов выполняют вещества различной химической природы, получившие название стабилизаторов, или антикоагулянтов.

**Физиологические антикоагулянты.** Основными физиологическими антикоагулянтами, предотвращающими прижизненное свертывание крови, являются гепарин, антитромбин, антитромбопластин и др. Эти естественные антикоагулянты замедляют также свертывание изъятной крови.

*Гепарин* резко снижает активность тромбина, образуя с ним неактивный обратимый комплекс, и тормозит активацию протромбина, соединяясь с тромбопластином также в неактивный комплекс.

По химической природе гепарин является мукополисахаридом, в состав которого входят глюкозамин, глюкуроновая кислота и эфирносвязанная серная кислота. Относительно много гепарина в печени, легких, мышцах, в меньшем количестве он содержится в селезенке, сердце, почках, кишечнике и других органах и тканях.

Препараты гепарина широко используются в качестве естественного стабилизатора крови при ее переливании. Активность их обозначают титром, т. е. количеством миллилитров крови, которое стабилизируется 1 г гепарина в течение 24 ч при комнатной температуре. Кроме того, препараты гепарина являются лечебным средством, ускоряющим процесс фибринолиза.

*Антитромбин* – вещество белковой природы инактивирующее тромбин. Антитромбиновое действие плазмы и сыворотки крови связано с альбуминовой фракцией. Антитромбин осаждается сернокислым аммонием при 65% насыщения. Антитромбиновая активность плазмы сохраняется без изменений при температуре 4°C в течение двух недель.

*Антитромбопластин* инактивирует тромбопластин в присутствии ионов кальция. По химической природе антитромбопластин является белком фракции глобулинов плазмы, осаждается 40-50% - ным раствором сернокислого аммония, растворим в воде, теромолабилен.

**Нефизиологические антикоагулянты.** При промышленной переработке крови в качестве ее стабилизаторов широко применяют оксалаты (щавелевокислый калий), цитраты (лимоннокислый натрий), одно- и двухзамещенные фосфаты, пирофосфаты, сульфаты и другие стабилизаторы, действие которых сводится к связыванию ионов кальция и тем самым к выключению их из системы свертывания крови. Для предотвращения свертывания крови достаточно удалить половину ионов кальция. На этом основана стабилизация крови с помощью ионообменной адсорбции (кальций крови заменяется натрием ионообменной смолы).

При удалении ионов кальция из системы свертывания затормаживается образование тромбина. Это подтверждается тем, что введение готового тромбина в кровь, освобожденную от кальция, приводит к свертыванию крови.

Другую группу стабилизаторов составляют катионы магния и бериллия, резко угнетающие активность тромбопластина.

При использовании крови на пищевые цели в качестве стабилизатора применяют хлористый натрий, который угнетает тромбин и тормозит превращение фибрин-мономеров в фибрин-полимеры. Однако стабилизирующий эффект его для крови разных животных оказывается неодинаковым.

Многочисленные синтетические полимерные эфиры сложных углеводов (крахмала, целлюлозы, декстринов и других соединений), получившие название синантринов, характеризуются сходным с гепарином противосвертывающим действием. Однако ввиду токсичности они не находят широкого применения.

### **1.2.3 Дефибрирование крови.**

При дефибрировании от крови отделяют фибрин. Кровь, используемую на пищевые и лечебные цели, дефибрируют через 1 мин с момента сбора крови – пока она не образовала сгустков.

Пищевую кровь перемешивают течение 2-5 мин вручную или на машинах-дефибринаторах. Дефибринатор укомплектовывают тремя сменными

бачками и мешалкой. Фибрин, выделившийся в виде нитей, отделяют, а кровь с остатками фибрина пропускают через сита с отверстиями диаметром 1-2 мм. Выход фибрина составляет 5%.

Дефибринирование свернувшейся технической крови заключается в разбивании сгустков крови и отделении от нее фибрина. Для этого свернувшуюся кровь измельчают на измельчителях – десмембраторе, дезинтеграторе и других (до частиц 2-3 мм). Измельченную кровь отстаивают в течение 30 мин. В результате фибрин как более легкий всплывает. При этом выход фибрина равен 10-12%. Для уменьшения потерь сгустки вторично измельчают на десмембраторе или центрифугируют.

Кровь из приемного бака цеха убоя скота и разделки туш попадает в центробежную машину, в которой происходит последовательно сначала грубое измельчение сгустков подвижными ножами, а затем тонкое измельчение частиц фибрина за счет центробежного продавливания через отверстия (0,6-1 мм) перфорированного вращающегося барабана. Кровь из центробежного измельчителя через приемник, минуя отстойник, направляется в распылительную сушилку. Этот способ позволяет осуществить непрерывный процесс изготовления альбумина из нестабилизированной крови, исключить отходы в виде фибрина, увеличить выход альбумина примерно на 3%, повысить производительность труда, улучшить санитарно-гигиеническое состояние производства, сократить производительную площадь.

#### **1.2.4 Сепарирование крови**

При сепарировании стабилизированную кровь разделяют на две фракции: на плазму и форменные элементы, дефибринированную кровь – на сыворотку и форменные элементы. При необходимости с помощью специальных сепараторов форменные элементы можно разделить на отдельные фракции (эритроциты, лейкоциты, тромбоциты).

Кровь разделяют на две фракции в барабане кровяного сепаратора, работающего по схеме разделителя. Кровь с температурой 25-30<sup>0</sup> С непрерывной струей поступает в пакет конических тарелок и под действием центробежной силы разделяется на две фракции.

Легкая фракция (сыворотка и плазма) движется к центру барабана и под давлением новых порций по наружным каналам тарелкодержателя поднимается в верхнюю часть барабана, удаляется через отверстия в разделительной тарелке в приемник легкой фракции.

Тяжелая фракция, содержащая наряду с форменными элементами также определенное количество плазмы (сыворотки), поступает к периферии барабана и по каналам между разделительной тарелкой и крышкой отводится в приемники фракции.

Скорость вращения барабана не должна создавать в нем давления выше  $10 \cdot 10^5$  Па, так как в противном случае происходит гемолиз. Для уменьшения пенообразования при сепарировании применяют олеиновую кислоту, разведенную кровяной плазмой 1:10 и подогретую перед употреблением до 50-55<sup>0</sup> С.

На предприятиях мясной промышленности для сепарирования крови применяют тарельчатые разделители открытого типа (выгрузка осадка вручную).

При увеличении производительности сепаратора выход сыворотки снижается. На современных промышленных сепараторах достигается выход легкой фракции до 65% по отношению к общей массе крови. Длительность цикла зависит от типа сепаратора – от 2 до 5 ч. По истечении этого времени разделение на фракции ухудшается. Сепаратор необходимо остановить, разобрать, удалить осадок и промыть.

В результате сепарирования плазма (сыворотка) в некоторой степени освобождается от микроорганизмов – основная масса их задерживается в осадке.

### **1.2.5 Коагуляционное осаждение белков крови и консервирование крови**

В настоящее время в промышленной практике применяют метод выделения белков крови посредством тепловой или химической коагуляции.

Термическая коагуляция может осуществляться при 90-95<sup>0</sup> С. В этих условиях значительно понижается микробиологическая обсемененность.

Содержание влаги в коагуляте составляет около 50%. Недостатком этого способа является изменение функциональных свойств белков крови вследствие их денатурации.

Белки можно выделить обработкой крови или ее фракции реагентами в кислой среде при рН 3,5-4,5. В качестве химических реагентов используют полифосфат натрия, трихлорид железа, лигнин и его производные. Использование этого метода позволяет почти полностью (до 98%) выделить белки из крови. После нейтрализации белковый коагулянт высушивают и его можно использовать на пищевые цели.

Для предотвращения развития микробиологических процессов дефибрированную или стабилизированную кровь, сыворотку, плазму и форменные элементы направляют на дальнейшую переработку сразу же после получения. Продолжительность хранения после сбора при 15<sup>0</sup> С не должна превышать 4 ч для крови и 2 ч для сыворотки, плазмы и форменных элементов.

Сроки хранения крови или сыворотки можно увеличить добавлением 10% - ного насыщенного раствора хлорида натрия. В таком виде их можно хранить при температуре не выше 4<sup>0</sup> С в течение 2 сут.

В качестве консервантов используют также аммиак, диоксид углерода, смесь цитрата натрия с бензойной кислотой и хлоридом натрия, пиросульфит натрия, молочную кислоту и другие вещества.

Кровь, используемую для технической продукции, можно консервировать антисептиками: крезолом или фенолом в количестве 2,5 кг на 1 т крови, аммиаком в количестве 20% и другими химическими веществами.

При использовании крови и ее фракции на пищевые цели их консервируют холодом. Сроки хранения охлажденной крови весьма ограничены: плазму можно хранить при 0-2<sup>0</sup> С не более 4-5 сут, при 4<sup>0</sup> С – 8 ч.

Продолжительное хранение крови и ее компонентов можно обеспечить замораживанием. Кровь, плазму и сыворотку, помещенные в тару, можно замораживать в морозильных камерах и аппаратах. В этом случае исключается необходимость размораживания крови или ее фракции перед их использованием при производстве мясопродуктов.

Продолжительность хранения крови при - 10<sup>0</sup> С составляет 6 мес. Оттаивание крови сопровождается гемолизом. В настоящее время разработаны специальные установки для закрытого сбора крови, ее стабилизации, сепарирования, охлаждения и консервирования с помощью химических реагентов. Их применение обеспечивает высокую производительность, хороший санитарный режим, возможность дистанционного контроля и регулирования процессов.

### **1.2.6 Обесцвечивание крови**

Степень полноты использования белков крови при производстве мясопродуктов ограничивается специфической окраской гемоглобина. Принимая во внимание, что на долю гемоглобина приходится около 60% белков, он является одним из главных потенциальных источников белка. Значение гемоглобина в питании определяется высоким содержанием железа в легкоусвояемой форме. В настоящее время разработаны ряд химических

методов обесцвечивания гемоглобина и физико-химические способы воздействия на системы, содержащие гемоглобин, которые позволяют маскировать их окраску. Их применение в промышленности будет способствовать увеличению масштабов использования белков крови при производстве мясопродуктов.

Химические методы обесцвечивания основаны на удалении гема. Разработан ряд способов, предусматривающих отделение гема от гемоглобина в кислой среде в присутствии ацетона. Выделенный глобин обладает эмульгирующей способностью. Однако удаление гема снижает устойчивость белка к денатурации, что отражается на его функциональных свойствах. Реализация указанного способа связана с определенными трудностями и требует значительных затрат.

Обесцвечивания гемоглобина можно достигнуть обработкой пероксидом водорода. Способ предусматривает гемолиз эритроцитов при добавлении воды, нагревание суспензии до  $70^{\circ}\text{C}$  в присутствии пероксида водорода. На заключительном этапе реакции для разрушения  $\text{H}_2\text{O}_2$  в раствор вводят каталазу. Обесцвеченный белок нерастворим в воде. Его используют при производстве колбас и рубленых полуфабрикатов.

Применение химических методов обработки крови и эритроцитов с целью обесцвечивания может повлиять на функциональные свойства белков и отразиться на их биологической ценности вследствие разрушения незаменимых аминокислот.

Нежелательное влияние гемоглобина на цвет мясопродуктов можно устранить путем использования жировых эмульсий, содержащих кровь или эритроциты в сочетании с молочными белками. Введение в эмульсии казеината натрия устраняет дефицит изолейцина и метианина. Эмульгирование крови с жиром в присутствии казеината натрия может быть осуществлено посредством ультразвуковой обработки. Полученные эмульсии отличаются хорошей стабильности при хранении и нагревании. Положительно оценивается метод получения содержащих кровь эмульсий с использованием гомогенизации при повышенном давлении.

Разработка новых методов и оборудования для переработки крови, предусматривающих ее осветление, и внедрение их в промышленную практику существенно увеличат резервы заменителей мясного белка.

### **1.2.7 Сушка крови**

Высушивание крови и ее фракций обеспечивает длительное хранение продуктов при нерегулируемой температуре и существенно облегчает их транспортирование. Условия и режимы сушки крови и ее фракции должны обеспечить в максимальной степени сохранение функциональных свойств содержащихся в них белков.

В настоящее время кровь обезвоживают главным образом посредством распылительной суши. Сушка крови в состоянии высокой дисперсности резко повышает интенсивность испарения влаги в результате увеличения удельной поверхности высушиваемого материала. Сопутствующее распылению уменьшение размеров частиц сводит к минимуму влияние скорости внутренней диффузии на интенсивность удаления влаги, замедляющей влияние явления термовлагопроводности.

Благодаря высокой дисперсности, достигаемой распылением крови, основная масса воды удаляется за несколько секунд, что обуславливает устойчивость белков к последующему воздействию повышенных температур. В то же время высокая интенсивность испарения влаги из материалов в начальный момент сушки приводит к резкому снижению температуры теплоносителя и обеспечивает сравнительно низкий температурный уровень высушиваемого продукта. Температура материала на заключительном этапе сушки не поднимается выше  $50-60^{\circ}\text{C}$ , хотя сушильный агент поступает с температурой выше  $100^{\circ}\text{C}$ .

Кратковременность воздействия повышенных температур в процессе обезвоживания крови позволяет свести к минимуму денатурационные изменения белков и тем самым обеспечивает высокую степень их растворимости в высушенном продукте. Полученный в результате распылительной суши тонкий порошок при контакте с водой весьма быстро без предварительного измельчения переходит в раствор. Высокая скорость распылительной суши позволяет осуществить процесс в непрерывном потоке при его полной автоматизации. Кровь можно распылять с помощью форсунок или центробежных дисков.

Распыление форсунками может быть пневматическим и гидравлическим. Пневматические распылительные устройства действуют по принципу инжектора. Распыление жидкости в них достигается действие струи сжатого воздуха давлением  $2,5-7 \cdot 10^5$  Па. Кровь в форсунки подается самотеком. При небольшой производительности пневматические форсунки требуют сравнительно больших затрат энергии и сложны в обслуживании.

Гидравлические (механические) распылительные устройства представляют собой перемещающиеся по окружности или неподвижные форсунки, через отверстия которых под давлением  $50 \cdot 10^5$  Па и выше выбрасывается кровь. Установки с подвижными форсунками в зависимости от производительности имеют 4, 6 и 9 форсунок, диаметр выходных отверстий которых 0,5-1 мм. Устройства с подвижными форсунками имеют их 2-3 с диаметром отверстий 1,3-1,7 мм.

Скорость струи является функцией давления, под которым подается кровь в форсунку. Увеличение дисперсности позволяет повышать температуру подаваемого воздуха, практически не влияя на содержание растворимых белков.

Гидравлический способ распыления достаточно экономичен по расходу энергии. Однако его существенным недостатком является забивание отверстий форсунок примесями, что вызывает необходимость обязательной фильтрации крови перед распылением. Кроме того, под шлифующим действием струи

жидкости диаметр отверстий в форсунках довольно быстро возрастает, что приводит к нарушению нормального режима работы сушилки.

Центробежное распыление крови производится при помощи быстровращающегося диска, снабженного четырьмя или более каналами, расположенными радиально. Кровь самотеком подается в воронку диска, откуда попадает в каналы, сечение которых уменьшается в радиальном направлении. Степень распыления крови вращающимся диском является функцией окружной скорости.

Частота вращения составляет  $(8-10) \cdot 10^3 \text{ мин}^{-1}$ . Производительность диска около  $0,5 \text{ м}^3/\text{ч}$ . Увеличение частоты вращения до  $3 \cdot 10^4 \text{ мин}^{-1}$  обеспечивает значительно большую дисперсность крови, а следовательно, и возможность повышения температуры сушки. Дисковое распыление обеспечивает высокую степень дисперсности крови, причем отверстия в диске во время работы не засоряются и нет необходимости останавливать сушилки для очистки распыляющих устройств, как это имеет место при форсуночном распылении.

При всем различии в конструкциях распылительных сушилок общими для всех сушилок являются следующие элементы: сушильная камера, распыляющее устройство, устройство для улавливания порошка, уносимого воздухом, подогреватель, приспособление для выгрузки сухого продукта, вентиляторы и фильтр для очистки воздуха, воздуховоды и распределитель воздуха.

Обезвоживаемый материал распыляется в сушильной камере, где смешивается с нагретым воздухом и обезвоживается. Большая часть сухого материала в виде пыли падает на дно камеры и непрерывно отводится оттуда разгрузочным устройством. Отработавший воздух с уносимой им частью сухого порошка удаляется из камеры через пылеуловительные устройства и выбрасывается в атмосферу.

В зависимости от направления движения теплоносителя относительно направления потока распыленного материала сушилки могут быть прямоточными, противоточными, со смешанным движением теплоносителя и воздуха.

Сушильные камеры (башни) распылительных сушилок бывают цилиндрической и цилиндроконической формы. Преимущество последней состоит в том, что при направленном потоке воздуха по спирали сушильные камеры работают как циклон и поэтому не нуждаются в специальном разгрузочном устройстве.

Важным элементом распылительных установок являются устройства для улавливания пыли. Высушенные частицы могут длительное время находиться во взвешенном состоянии, особенно при наличии воздушного потока. Значительная часть пыли высушенного материала увлекается потоком отходящего воздуха или газа. Величина уносимой пыли может составлять в распылительных устройствах до 40% общего количества высушенного материала. Поэтому улавливание пыли необходимо как с точки зрения экономических соображений, так и с точки зрения предотвращения загрязнения окружающей среды.

Пыль от отходящего воздуха отделяется либо с помощью встряхивающих рукавчатых фильтров, либо в циклонах. Рукавчатый фильтр состоит из

прямоугольного или цилиндрического кожуха с коническим днищем, образующим бункер. Внутри кожуха находятся матерчатые рукава, которые периодически встряхиваются для удаления осевшей пыли.

Основными достоинствами рукавных фильтров являются высокая степень обеспыливания (95-96%) и удобство выгрузки пыли. К недостаткам таких фильтров относят колебания в производительности вследствие запыленности ткани и забивка ее при фильтрации влажной пыли, что резко сказывается на снижении производительности.

Наряду с рукавными фильтрами в распылительных установках широко применяют циклоны, действие которых основано на использовании центробежной силы. Степень обеспыливания отходящих газов в циклонах зависит от размера частиц, удельной массы пыли, ее концентрации в очищенном газе, скорости воздуха на выходе в циклон и размеров циклона.

Обогрев воздуха, подаваемого в сушилку, можно производить в калорифере или путем смешивания с газообразными продуктами сгорания топлива. Обычно для подогрева употребляют паровые пластические калориферы, значительно реже – электрические и огневые.

При получении пищевой продукции важно, чтобы наружный воздух, поступающий в калорифер, был очищен. Для этой цели перед калорифером устанавливают серию рам с натянутым материалом, проходя через который воздух очищается. Часто воздух очищают с помощью висциновых фильтров (пустотелые кольца или клетчатые рамы, смазываемые вискозином).

Производительность сушильной установки 500 кг испаренной влаги в час. Кровь из емкости поступает в полость распылительного диска. Воздух, нагретый в калорифере, за счет работы всасывающего вентилятора выходит в камеру через распределительные жалюзи, установленные над диском. При выходе из жалюзи воздух, имеющий температуру 140° С, приобретает вихреобразное движение, и, контактируя с распыленной кровью, ее обезвоживает.

Высушенная кровь в виде порошка падает на дно сушильной башни, откуда непрерывно удаляется вращающимися радиально расположенными скребками, направляющими ее к отверстиям, через которые она ссыпается в шнек, а затем поступает в линию пневмотранспорта. Отработавший воздух отсасывается вентилятором и проходит через циклоны. Отделенные частицы сухого продукта поступают в систему трубопроводов пневмотранспорта, соединенного с циклоном, для окончательного их отделения.

В сушилках с форсуночным распылением кровь, поступающая на обезвоживание из бака, проходит через стаканчиковые фильтры и плунжерным насосом под давлением 5-10<sup>5</sup> Паг нагнетается во вращающиеся на колонке форсунками, которыми выбрасывается в камеру, образуя факел распыленной крови. Воздух, нагретый в калорифере, поступает через хобот в верхнюю часть башни через воздухораспределитель в виде шлицы. После высушивания основная масса обезвоженной крови опускается на дно башни и непрерывно вращающимися скребками сметается в бункер, откуда попадает в разгрузочный шнек. Задержанные фильтром частицы высушенного материала ссыплются вниз и из бункера отводятся шнеком.

Экономичность распылительной сушки можно значительно повысить, предварительно упаривая кровь и используя тепло и влагоемкость отходящего воздуха для предварительного подогрева и частичного обезвоживания крови, подаваемой в сушилку. Предварительным упариванием можно удалить до 60% содержащейся в крови влаги, что повысит содержание сухого остатка с 17 до 35%. Во избежание денатурации белков крови выпаривание следует вести при температуре не выше 35-40<sup>0</sup> С в условиях вакуума при остаточном давлении 5,32-6,66\*10<sup>5</sup> Па.

Кровь и ее фракции можно сушить в виброкипящем слое. Кровь с помощью пневматической форсунки наносится тонким слоем на гранулы из инертного материала (фторопласт-4), расположенные на вибрирующей решетке. Воздух поступает в камеру с температурой 100-125<sup>0</sup> С в противотоке движению гранул. В результате трения гранул высушенная пленка крови отделяется и уносится с помощью отсасывающего вентилятора в циклон.

### **1.2.8 Гемолиз крови**

В процессе хранения и переработке крови при определенных условиях гемоглобин может переходить из эритроцитов в плазму и, растворяясь в ней, окрашивать ее в более или менее интенсивный красный цвет. Такое явление называется гемолизом.

Различают гемолинолиз – переход в плазму только лабильно связанного гемоглобина – и строматолиз – переход в плазму значительной части прочно связанного гемоглобина. Гемолинолиз вызывается увеличением проницаемости поверхностного слоя эритроцитов при понижении

осмотического давления плазмы, воздействию поверхностно-активных веществ, а также под влиянием других причин. Строматолиз наступает при полном разрушении поверхностного слоя эритроцитов, разрыве липидной связи между стромой и гемоглобином. Причиной такого явления могут быть различные факторы, в частности воздействие органических растворителей, поверхностно-активных веществ, химических агентов, механическое воздействие и т.п.

Наиболее часто при переработке крови гемолиз происходит в результате ее разбавления. Устойчивость эритроцитов разных животных к понижению осмотического давления окружающей среды неодинакова. Наиболее устойчивы эритроциты кроликов, менее лошадей, крупного рогатого скота и еще менее устойчивы эритроциты свиней. Гемолиз может быть вызван различными солями, в том числе и солями железа. Поэтому во избежание гемолиза следует поддерживать чистоту используемого оборудования.

### **1.2.9 Автолитические превращения**

Изъятая кровь животных подвержена различным изменениям. При хранении крови большая часть изменений вызывается ферментами (автолитические изменения), а некоторые связаны с естественной неустойчивостью компонентов крови. Если кровь хранить при низкой положительной температуре, то эти превращения можно свести до минимума. При  $0^{\circ}\text{C}$  в случае длительного хранения осаждается значительное количество

фибриногена и нерастворимого на холоду глобулина, поэтому более приемлемой для хранения крови является температура несколько выше 0° С.

При хранении в эритроцитах крови происходят гликолитические превращения, приводящие к накоплению молочной кислоты. Кроме того, в результате распада органических фосфорных соединений в плазме увеличивается содержание неорганических фосфатов. Результатом этих превращений является понижение рН крови с 7,3-7,4 до 6,8-7,0.

Понижение кислотности приводит к активации протеиназ лизосом лейкоцитов и выходу их из ограничивающих структур. Активируются и протеиназы эритроцитов. Важными аутолитическими изменениями являются и фибринолитические превращения в результате активации пламина.

Протеолитическая активность протеаз тормозится содержащимися в крови антипротеазами. В изъятой крови образованию активного пламина способствует разрушение его ингибиторов (антипротеаз). При изъятии крови в плазму переходят тканевые активаторы, способствующие активации пламина. Кроме того, образование пламина из пламиногена ускоряется автокаталитически. При аутолизе крови тромбин способен катализировать превращение пламиногена в пламин.

К числу факторов, ускоряющих образование активного пламина, относится также действие ряда ферментов бактериального происхождения, активирующих плазменный проактиватор и превращающих его в активатор (скорость таких превращений повышается с повышением температуры), а также некоторые химические вещества (хлороформ, цианистый и роданистый калий, эфир, тимол, мочевины, салициловокислый натрий и другие солибилизующие вещества), которые разрушают ингибиторы пламина.

Совместное воздействие всех протеиназ вызывает специфически распад фибриногена и фибрина, а также распад других белков крови. В результате этого в плазме нарастает количество белковых фрагментов; количество остаточного азота при этом увеличивается незначительно, что объясняется специфичностью протеиназ крови.

При хранении крови заметно изменяются липопротеиды плазмы. Хранение сыворотки при 4° С в течение 3 суток в условиях, близких к стерильным, вызывает нарушение устойчивости связи между липидом и белком, в результате чего возрастает скорость экстрагирования липидов эфиром. Наряду с этим происходит окисление липидов, прежде всего каротиноидов, а затем эфиров ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав несвязанных липидов и липопротеидов.

### **1.2.9.1 Биохимические превращения под воздействием микробов**

Изъятая кровь, будучи хорошей питательной средой для микрофлоры, может быстро подвергаться микробной порче.

Превращения под действием ферментов микробов, опережая собственного аутолитические процессы, сводятся большей частью к гнилостному разложению белков крови, при этом выделяются дурно пахнущие вещества: скатол, индол, фенол, меркаптаны и другие вещества распада.

В результате накопления продуктов распада часто происходит гемолиз. Освобождающийся гемоглобин окисляется и переходит в метгемоглобин и другие производные. При воздействии бактерий на продукты распада белков, содержащих серу, образуется сероводород. В присутствии сероводорода и кислорода гемоглобин и оксигемоглобин превращаются в зеленые пигменты – сульфгемоглобин, холеглобин и др. Образовавшиеся пигменты придают испортившиеся крови черный оттенок.

Под воздействием ферментов микроорганизмов в крови независимо от превращений гемоглобина протекают процессы окисления ненасыщенных липидов. Однако эти процессы могут вызвать реакции взаимного окисления, ускоряющие как прогоркание липидов, так и окисление гемоглобина.

Легкость бактериального загрязнения крови и чрезвычайно быстрый рост бактерий даже при минимальном загрязнении могут приводить к образованию в крови значительного количества пирогенных веществ. Поэтому во избежание порчи кровь, предназначенную для пищевых целей и особенно для лечебно-питательных препаратов, необходимо перерабатывать очень быстро. Если же сразу после изъятия кровь не перерабатывают, то ее обрабатывают нетоксичными консервантами: поваренный солью или фибризол (смесь 30% ортофосфата, 30% пирофосфата натрия и 40% хлористого натрия). Эти консерванты одновременно являются и стабилизаторами крови. Кровь, предназначенная для технических целей, консервируют крезолом, фенолом или другими сильными антисептиками.

### **1.2.10 Биологические препараты и продукты из крови**

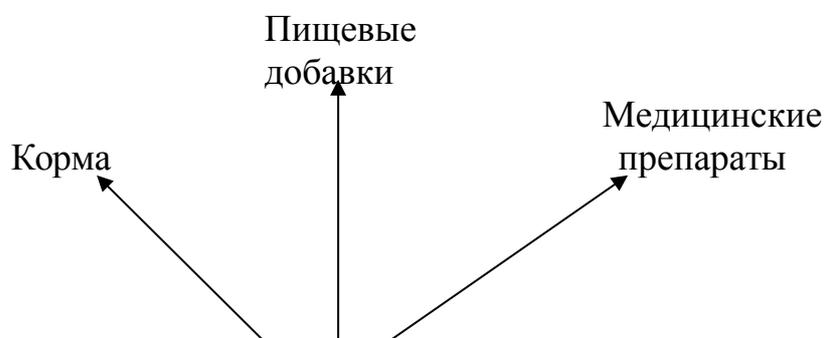
Кровезаменители изготавливают из крови животных, специально изъятой в момент убоя или прижизненно (в некоторых случаях после предварительного кровепускания на разных стадиях регенерации крови). Главным в процессе их получения является снятие антигенных свойств белков крови. Из сыворотки крови получают препарат БК-8. Из цельной крови или отдельных ее частей получают гидролизаты, которые используют как средство парентерального питания. К числу таких белковых гидролизатов относится раствор гидролизина,

получающийся при кислотном гидролизе, препарат аминокислот, производство которого основано на ферментативном гидролизе белков.

Из крови убойных животных изготавливают фибринные пленки (пластический материал при ожогах, плохо заживающих ранах и язвах), из сухой крови получают активированный уголь (при различных желудочно-кишечных заболеваниях, плохо заживающих гнойных ранах и т.д. используется как вещество, адсорбирующее газы и растворенные вещества).

Для изготовления лечебно-питательных препаратов (жидкого или сухого гематогена) используют дефибринированную жидкую или сухую кровь, а также предварительно стабилизированную сухую кровь. Гематоген применяется при лечебно-профилактическом питании и в комплексной терапии, направленной к стимуляции кроветворения. Схеме.2. показана где еще можно использовать кровь.

**Схеме 2. Схема использования крови животных**





### 1.2.10.1 Альбумин

**Светлый пищевой альбумин.** Пищевую кровь немедленно подвергают стабилизации или дефибринированию. Негемолизированная плазма, полученная в результате сепарирования стабилизированной крови, или сыворотка (из дефибринированной крови) высушивается в распылительных сушилках любого типа, лучше с предварительным выпариванием и использованием отработавшего воздуха. Плазму (сыворотку) и воздух, направляемые на сушку, фильтруют.

**Темный пищевой альбумин.** Сбор пищевой крови, стабилизация (дефибринирование), сепарирование производят так же, как при производстве светлого пищевого альбумина. Полученную стабилизированную (дефибринированную) кровь сушат, просеивают, охлаждают, затаривают, взвешивают и маркируют в условиях, аналогичных принятым при производстве светлого альбумина.

**Технический альбумин.** Техническую кровь собирают (стабилизируют) в желобе под линией обескровливания. Далее стабилизированную кровь направляют непосредственно на сушку и последующие операции, включая упаковку. Нестабилизированную кровь можно перерабатывать на механизированной линии.

По качественным показателям альбумин должен удовлетворять требованиям стандарта. Светлый пищевой альбумин – тонкий порошок, светло – желтого цвета (высший сорт) или с сероватым оттенком (I), запах 2% - ного водного раствора специфический, вкус слегка соленый. Содержание влаги в нем не более 10%. Он не должен содержать патогенной и условно – патогенной микрофлоры. Выход светлого пищевого альбумина составляет 8% к исходной сыворотке и 8,5% к плазме, темного – 18% к дефибринированной крови.

Пылевидный черный технический альбумин выпускают высшего и I сортов. Цвет его красновато – коричневый разных оттенков. Качественные показатели выше, чем у черного кристаллического альбумина. Содержание влаги в нем не более 11%.

Кристаллический черный технический альбумин выпускают I и II сортов. Он представляет собой блестящие крупинки, легко ломающиеся при нажиме. Комки шквары, посторонние примеси должны отсутствовать. Цвет – черный с красноватым отливом. Содержание влаги не более 13%.

### 1.2.10.2 Кровяная мука

Сырьем для ее производства служит цельная кровь всех видов животных и фибрин, получаемый при дефибринировании. Процесс производства кровяной муки сводится к коагуляции крови нагреванием, частичному механическому обезвоживанию коагулята и его высушиванию. Коагуляцию крови и фибрина выполняют в чане периодического действия или в коагуляторе непрерывного действия. Температура выгружаемого коагулята 85 – 90°C. Коагулят можно использовать как вареный корм, однако длительность

коагуляции должна составлять при перемешивании не менее 1 ч и использовать его можно только в день получения.

Весь процесс производства кормовой муки можно проводить в вакуум – горизонтальном котле. Однако длительность обработки в котле и расход пара значительны. При необходимости сухую кормовую муку измельчают и просеивают через сито с ячейками диаметром 3 мм.

Кровяная мука, полученная высушиванием в вакуум – горизонтальных котлах, представляет собой коричневато – красный порошок без комков со специфическим, но не посторонним запахом. Она не должна содержать механических примесей. Содержание влаги в муке I сорта должно быть не более 9%, II сорта – не более 11%.

В производстве кормовой муки в настоящее время начинают применять агрегаты непрерывного действия. Длительность сушки коагулята – около 30 мин. Производительность установки 385 кг/ч.

### 1.2.10.3 Гематоген

**Сухой гематоген.** Для изготовления сухого гематогена используют свежую (не позже 2 ч после убоя) пищевую стабилизированную или дефибринированную кровь крупного рогатого скота и свиней, а также пищевой глицерин 12,5 %. Полученную смесь сушат в распылительной сушилке при температуре 70 -80<sup>0</sup> С. Она содержит более 75% растворимых белковых веществ. Выход сухого гематогена – 17 %. В реализацию продукт поступает в виде мелкого распыленного порошка или таблеток. Хранят его в сухом, проветриваемом помещении.

**Феррогематоген.** Его можно получить при добавлении в сухой гематоген восстановленного железа и пищевого глицерина. Состав препарата: сухой гематоген – 83%, восстановленное железа – 12%, пищевой глицерин – 5%.

**Жидкий гематоген.** Это один из широко распространенных препаратов из крови. Его вырабатывают дефибринированной кровью, либо форменных элементов, полученных сепарированием. Компонентами этого препарата являются кровь, сахар, спирт, ванилин или ароматическая эссенция. Рецепт жидкого гематогена следующая (в %): жидкая пищевая кровь – 58, сахарный сироп – 36, спирт – ректификат – 6, ванилин (ароматическая эссенция) – 0,008 (0,3 – 0,5).

Жидкий гематоген разливают в стерилизованные флаконы на машинах, пастеризуют в воде при температуре 52<sup>0</sup> С в течение 75 мин (пастеризацию можно вести до розлива в закрытых емкостях), охлаждают до комнатной температуры, осмоливают, этикетировывают и укладывают в деревянные ящики.

**Детский гематоген.** Молоко (126 л на 100 кг готовой продукции) упаривают с сахаром (63 кг), добавляют патоку (28 кг). Полученную массу охлаждают до 60 – 65<sup>0</sup> С и вносят сухой гематоген (5,1 кг) и ванилин (12 г) или фруктовую эссенцию (100 мл). Тщательно перемешанную массу выкладывают на чугунную плиту, смазанную пищевым жиром. Остывшую массу раскатывают на пластины, разрезают на плитки и упаковывают, как шоколад.

**2 Раздел 2.1 Экспериментальная часть.  
2.1 Цель и задачи исследования.**

Целью настоящей работы является изучение биохимического свойства крови лошади используемой в производстве колбасных и полуфабрикатных изделий, а также при получения лечебных препаратов.

В связи поставленной цели в данной работе необходима было решить следующие задачи:

- Получить чистой крови для анализа;

- изучить биохимическую свойству лошадиной крови;
- провести биохимическую и клиническую анализ крови лошади;
- провести сравнительный анализ биохимических свойств лошадиной крови;
- определить кровь какой лошадей является самый ценным;

## **2.2 Материалы и методы исследований.**

Для проведения экспериментальных работ использовали: цельную стабилизированную кровь полученный из вены лошади. При получение крови использовали обработанную гепарином 10 мл шприц.

Экспериментальные исследования проводились в хоз расчетной лабораторий в 14 мая 2007 г.

В работе использованы общепринятые методы биохимических и клинических исследований: определение общей белок в крови в том числе альбумин, глобулин. гемоглобин, холестерин, сахар крови, общий билирубин, прямой билирубин, остаточный азот, мочевины, Аспарат – аминотрансфераза (АсАТ), Алланинаминотрансфераза (АлАТ), Тимоловая проба, диастаза крови и общая количества эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов. СОЭ.

Повторность анализов – трехкратная.

Экспериментальный часть состоять из 4 этапов: определение общего количества эритроцита, определение общего количества лейкоцита, определение общего количества тромбоцита и определение биохимического свойства.

### **Проведение клинического анализа.**

#### **Этап 1. Определение количества эритроцитов.**

##### **Взятие крови**

**Пробирочный метод.** Принцип. Точное отмеривание крови и равномерное разведение ее в точно отмеренном количестве жидкости.

**Посуда и аппаратура.** 1. Обыкновенные химические или более короткие серологические пробирки. 2. Капиллярная пипетка от гемометра Сали. 3.

Склянки для разводящих жидкостей. 4. Градуированная пипетка для отмеривания разводящих жидкостей.

**Реактивы.** 0,85-3% раствор хлорида натрия, или раствор Гайема. 5 г сулемы, 37,5 г сульфата натрия растворяют в дистиллированной воде до объема 1 л. К этому раствору прибавляют 0,4 г красителя (толуидинового синего или метилового фиолетового, или кризилового синего). При прибавлении красителя хорошо окрашиваются ядра лейкоцитов, поэтому во время подсчета в камере эритроциты легко отличить от лейкоцитов, что важно при большом количестве лейкоцитов в крови и малом количестве эритроцитов. Этот раствор по сравнению с другими лучше сохраняет эритроциты; или раствор Дейчи: 1 мл 40% формалина доливают до объема 100 мл 3% цитратом натрия.

**Методика.** В предварительно высушенную чистую пробирку точно отмеривают пипеткой 4 мл разводящей жидкости и закрывают резиновой пробкой. Если предварительно была взята кровь для определения количества гемоглобина, то остатки ее удаляют с кожи тампоном, затем, слегка надавливая, выпускают свежую каплю и набирают из нее капиллярной пипеткой от гемометра Сали 20 мкл крови. Эту кровь осторожно выдувают в пробирку с разводящей жидкостью, промывают этой жидкостью пипетку, закрывают резиновой пробкой тщательно перемешивают. Полученное разведение 1:201 можно принять равным 1:200.

Капиллярная пипетка для взятия крови с целью исследования количества эритроцитов должна быть особо отмечена (например, на ее кончик натягивают кусочек цветной резиновой трубки); для других целей ее не используют. Перед взятием крови пипетку промывают разводящей жидкостью для эритроцитов, чтобы предохранить последние от разрушения.

**Взятие крови для общего анализа.** Иногда по тем или иным причинам у лошади невозможно взять кровь отдельно для определения количества гемоглобина, эритроцитов и лейкоцитов. В этом случае кровь, взятую у лошади, разбавляют 5% раствором цитрата натрия и уже в лаборатории производят в этой цитратной крови все необходимые исследования, входящие в общий клинический анализ. Делать мазки из этой крови не рекомендуется, так как клетки в ней изменяются и при подсчете лейкоцитарной формулы будут допущены ошибки. Поэтому мазки крови нужно брать, как обычно, на предметное стекло.

**Посуда и аппаратура.** 1. Видалевская пробирка. 2. Пипетка от аппарата Панченкова. 3. Предметные стекла. 4. Шлифованные стекла. 5. Игла-скарификатор со съемными копиями.

**Реактивы.** 1. 5% раствор цитрата натрия. 2. Спирт. 3. Эфир.

**Методика.** В видалевскую пробирку наливают 5% раствор цитрата натрия, желательно стерильный, в количестве, соответствующем 50 делениям пипетки от аппарата Паченкова, и той же пипеткой берут кровь до метки «0» два раза, выдувая ее в ту же пробирку. Разведение равно 1:1,25. Из этой пробирки в лаборатории обычным методом набирают цитратную кровь в смесители, пробирки или пипетки. После подсчета форменных элементов в цитратной крови в счетной камере и определения гемоглобина необходимо в эти результаты внести поправку на разведение крови цитратом натрия, т.е.

приплюсовать к найденной величине одну четверть от нее. В этой цитратной крови определяют скорость оседания эритроцитов обычным методом без указанного выше пересчета.

### Подсчет эритроцитов

**Подсчет в счетной камере.** Специальное оборудование. 1. Микроскоп. 2. Камера Горяева.

Счетная камера состоит из толстого прямоугольного стекла с сеткой, выгравированной непосредственно на нем или на специально наклеенной для этого стеклянной пластинке. В настоящее время в большинстве случаев пользуются камерой с двумя сетками Горяева, разграниченными между собой глубокой поперечной канавкой. Сбоку сеток находятся стеклянные прямоугольные пластинки, к которым притираются специальные шлифованные покровные стекла.

Сетка Горяева состоит из 225 больших квадратов ( $15 \times 15$ ). Большие квадраты, расчерченные вертикально и горизонтально на 16 малых квадратов, чередуются с квадратами, разделенными только горизонтальными или вертикальными линиями, и с квадратами без линий. Имея в виду, что глубина камеры составляет  $1/10$  мм, а сторона малого квадрата –  $1/20$  мм находим, что объем камеры, соответствующий маленькому квадрату, равен  $1/4000$  мкл.

Перед заполнением камеры ее, так же как и покровное стекло, необходимо вымыть водой и насухо вытереть. Затем шлифованное стекло притереть к камере так, чтобы появились радужные так называемые ньютонovy кольца, ибо только при этих условиях будут соблюдены необходимая высота и тем самым объем камеры.

**Заполнение камеры.** Кровь, взятую в пробирки, необходимо перед заполнением камеры встряхнуть несколько раз, держа пробирку вертикально. После этого концом круглой стеклянной полочки отбирают из пробирки, наклоняя ее, каплю крови и заполняют камеру так, чтобы вся поверхность, на которой нанесена сетка, была заполнена жидкостью без затекания ее в бороздки и без пузырьков воздуха.

После заполнения камеру оставляют на 1 мин в покое для оседания форменных элементов. Затем камеру кладут на столик микроскопа, который должен быть строго горизонтальным, и приступают к подсчету форменных элементов при малом увеличении микроскопа (объектив  $8 \times$ , окуляр  $10 \times$  или  $15 \times$ ). Подсчет следует производить при затемненном поле зрения (прикрытой диафрагме или несколько опущенном конденсоре).

При гемолитических и пернициозной анемиях рекомендуется считать эритроциты сейчас же после их взятия, так как при длительном хранении они могут частично разрушиться. В случаях когда требуется большая точность, эритроциты считают на 2 сетках и результат берут среднеарифметический. Эритроциты считают в 5 больших квадратах ( $5 \times 6 = 80$  малых), расположенных по диагонали. Подсчету подлежат все эритроциты, лежащие внутри маленького квадрата, и те, которые находятся на левой и верхней линиях его или касаются их с той и другой стороны. Эритроциты, расположенные на правой и нижней

линиях или касающиеся их с обеих сторон, не считают, так как они будут сосчитаны в следующем квадрате. Результаты подсчета в каждом большом квадрате откладывают на 11-клавишном счетчике или записывают в столбик и затем суммируют их.

Вычисление количества форменных элементов в 1 мкл крови для всех сеток производится по следующей формуле:

$$X = \frac{a * 4000 * v}{b},$$

Где  $X$  – количество форменных элементов в 1 мкл крови;  $a$  - количество форменных элементов,  $b$  - количество сосчитанных малых квадратов;  $v$  – степень разведения крови; 1/4000 мкл – объем малого квадрата; умножая на 4000, приводим к объему 1 мкл крови.

**Источники ошибок.** 1. Образование сгустка. Брать кровь и размешивать ее с разводящей жидкостью нужно быстро, чтобы не образовался сгусток, который, увлекая часть клеток, снижает результаты исследования.

2. Несоблюдение условий, обеспечивающих правильную высоту камеры. Неправильное притирание покровных стекол без образования ньютоновых колец не создает нужной высоты камеры и искажает результаты. Кроме того, имеет значение толщина покровного стекла: тонкие стекла могут быть искривленными.

3. Несвоевременный подсчет эритроцитов сразу, не выжидая 1 мин, после заполнения камеры кровью; клетки при этом не успевают осесть на дно. Результаты получаются ниже действительных.

4. Недостаточное количество подсчитанных квадратов.

5. плохо вымытые капилляры и недостаточно высушенные пробирки.

6. Недоброкачество разводящего раствора, вызывающая гемолиз эритроцитов.

### **Среднее содержание гемоглобина в одном эритроците**

Среднее содержание гемоглобина в одном эритроците определяется делением концентрации гемоглобина в 1 мкл крови, выраженной в пикограммах, на число эритроцитов в том же объеме крови.

Среднее содержание гемоглобина в одном эритроците принято обозначать пикограммами (пг), или микропикограммами; 1мг равен 1 000 000 000 пг.

Клиническое значение. Показатель среднего содержания гемоглобина в одном эритроците очень важен для суждения о гипо- и гиперхромии эритроцитов. Гиперхромия зависит исключительно от увеличения объема эритроцитов (макроциты, мегалоциты), а не от степени насыщения их гемоглобином и является показателем нарушения функции печени, расстройства обмена витамина В<sub>12</sub> или недостатка последнего в организме (пернициозная анемия). В этих случаях среднее содержание гемоглобина в одном эритроците может повыситься до 50 пг.

Гиперхромия наблюдается вследствие уменьшения объема эритроцитов (микроциты) или понижения содержания гемоглобина в нормальном по объему эритроците. Это истинный показатель недостатка железа в организме. Среднее содержание гемоглобина в одном эритроците в этих случаях может понизиться до 20 пг.

## **Этап 2. Определение общего количества лейкоцита.**

### **Взятие крови**

**Пробирочный метод** (Н.М.Николаев). Принцип см. «Определение количества эритроцитов».

Посуда и аппаратура. 1. пробирки длиной 10 см и диаметром 1 см. 2. Градуированная пипетка емкостью 1 мл. 3. Остальное, как при определении количества эритроцитов тем же методом.

Реактив. 3-5% раствор уксусной кислоты, подкрашенный метиленовым синим.

Методика. В пробирку отмеривают пипеткой 0,4 мл 3-5% раствора уксусной кислоты. Затем капиллярной пипеткой от гемометра Сали набирают из свежей капли 20 мкл крови, осторожно выдувают ее в разводящую жидкость, закрывают резиновой пробкой и тщательно перемешивают. В этом случае кровь будет разведена в 21 раз.

После каждого взятия крови пипетка от гемометра Сали должна быть промыта дистиллированной водой и остатка последней удалены выдуванием в ватный тапмон.

### **Подсчет лейкоцитов**

**Подсчет в счетной камере.** Описание счетной камеры Горяева, заполнение ее кровью, методика подсчета форменных элементов и формула подсчета приведены в разделе подсчета эритроцитов в счетной камере. Лейкоциты считают в 100 больших квадратах, что соответствует  $100 \cdot 16 = 1600$  малым.

**Источники ошибок при подсчете лейкоцитов в счетной камере.** 1. при подсчете лейкоцитов в число их засчитывают и эритробласти, если таковые имеются. Для того чтобы правильно установить количество лейкоцитов, нужно из общего числа клеток вычесть количество эритробластов в 1 мкл крови.

2. Другие источники ошибок те же, что и при подсчете эритроцитов в счетной камере.

### **Получение лейкоконцентрата**

**Метод Поспеловой.** Принцип. Фракционирование составных частей крови за счет различия их удельного веса и ускорения оседания эритроцитов тринолом В.

Посуда и аппаратура. 1. Центрифужные цилиндрические пробирки емкостью 10 мл с резиновыми пробками. 2. Пипетки измерительные. 3.

Пипетки тонкие пастеровские. 4. Термостат. 5. Центрифуга 1500 об/мин. 6. Штатив для мазков. 7. Штатив для установки пробирок под углом 45°. 8. шприц. 9. Предметные стекла.

Реактив. 3% раствор трилона В.

Методика. В мерную центрифужную пробирку отмеривают 1 мл 3% раствора трилона В и 4 мл крови, взятой из вены самотеком. Осторожно смешивают и ставят в термостат под углом 45° при температуре 37° на 15-20 мин. Как только отделится 2-3 мл плазмы, верхний слой ее осторожно отсасывают пастеровской пипеткой и выливают. Нижний слой плазмы и лейкоцитарную пленку отбирают в центрифужную пробирку. Центрифугируют в течение 10 мин при 1500 об/мин. Из осадка готовят мазки, красят, как обычно мазки перфирической крови. При лейкопении берут двойной объем крови и трилона В. Кровь можно брать не натошак.

**Получение лейкоцента в спиральной центрифуге ЦС-1.** Принцип. Фракционирование составных частей крови за счет их разного удельного веса.

Посуда и аппаратура. 1. Центрифужные цилиндрические пробирки емкостью 10 мл с резиновыми пробками. 2. Пипетки тонкие пастеровские. 3. Предметные стекла. 4. Штатив для мазков. 5. Шприц. 6. Обычная центрифуга на 1000 об/мин. 7. Спиральная центрифуга ЦС-1 2500 об/мин. 8. Прозрачная полиэтиленовая трубка длиной 442 мм. 9. Ножницы.

Реактив. 3,8% раствор цитрата натрия.

Методика. Кровь из вены в количестве 4,5 мл смешивают с 0,5 мл 3,8% раствора цитрата натрия. Центрифугируют при 1000 об/мин в течение 5-7 мин в обычной центрифуге. Плазму отсасывают, а лейкоцитную пленку тонкой пастеровской пипеткой переносят в чистую пробирку. Прозрачную полиэтиленовую трубку завязывают узлом (узел не затягивают) и отпускают концом в пробирку с лейкоцитной пленкой. После насасывания крови в трубку узел затягивает до конца и трубку укладывают в специальную лунку центрифуги ЦС-1.

Далее поступают так, как указано в инструкции завода-изготовителя, приложенной к центрифуге.

Из полиэтиленовой трубки вырезают кусочек, в котором находится слой лейкоцитов. Этот лейкоконцентрат в виде серой массы выдувают шприцем на предметное стекло и после размешивания готовят из него мазки. Окраска обычная (по Романовскому или Паппенгейму-Крюкову). Для выделения гемограммы в каждом случае подсчитывают 500 форменных элементов крови.

Описанный метод позволяет увеличить концентрацию примерно в 70-100 раз по сравнению с количеством лейкоцитов в периферической крови. Он прост и физиологичен, позволяет в короткий промежуток времени получить достаточно высокую концентрацию морфологически и функционально полноценных лейкоцитов.

### **Приготовление, фиксация и окраска мазков**

Мазки крови делают на предметных стеклах с помощью более узкого шлифованного предметного стекла.

**Подготовка стекол.** 1. С предметных стекол, бывших в употреблении и соприкасавшихся с иммерсионным маслом, последнее удаляют сухой тряпкой или бензином. Затем стекла кипятят без мыла и соды в течение 15-20 мин, промывают чистой водой и погружают на 1 ч в насыщенный раствор двуххромовокислого калия в серной кислоте. Обработанные таким образом стекла промывают в течение не менее 1ч под струей водопроводной воды и насухо вытирают чистым полотенцем.

2. При отсутствии двуххромовокислого калия и серной кислоты стекла, бывшие в употреблении, кладут в мыльный раствор и выдерживают в нем 8-10 ч, а затем в том же растворе кипятят их 5-10 мин. От более длительного кипячения стекла делаются мутными. После кипения стекла вынимают и тщательно промывают под струей водопроводной воды и насухо вытирают.

3. Стекла, не бывшие в употреблении, промывают в горячей воде и насухо вытирают. Хранят стекла в стеклянной широкогорлой банке с крышкой.

**Приготовление мазков.** Взяв предметное стекло за длинные края, прикасаются его поверхностью (отступя 0,5-1 см от узкого края) к капле крови (но не к коже). Предметное стекло держат на столе или в левой руке за узкие края. Правой рукой приставляют шлифованное стекло узким краем к стеклу с кровью слева от капли под углом  $45^{\circ}$  и продвигают его вправо до соприкосновения с кровью. Выжидают, пока кровь расплывется по всему ребру шлифованного стекла, и затем легким быстрым движением ведут его справа налево до тех пор, пока не будет исчерпана вся капля. Капля крови должна быть небольшой и соразмерно так, чтобы весь мазок помещался на стекле, не доходя 1-1,5 см до его края. Нельзя прекращать размазывание и отнимать стекло раньше, чем капля будет исчерпана. Нельзя также сильно нажимать на стекло, так как многие клетки могут оказаться поврежденными. Хорошо сделанный мазок тонок, имеет желтоватый цвет и оканчивается «метелочкой».

Густо-розовые и красноватые мазки непригодны для счета, так как они слишком толсты и клеточные элементы при этом дифференцировать невозможно. После приготовления мазки быстро сушат на воздухе до исчезновения влажного блеска. При медленном высыхании может изменяться морфология клеток.

После необходимости переслать мазок с консультационной целью в другой город мазок рекомендуется делать на хорошо отмытой использованной рентгеновской пленке, нарезанной по размеру предметного стекла. Такие мазки можно пересылать в письмах.

**Симптом крошковатости мазка крови.** При заболеваниях, протекающих с повышенным содержанием фибриногена в крови, мазок, сделанный на предметном стекле, имеет крошковатый характер. На этот простой и доступный признак рекомендуется обратить особое внимание при взятии крови.

**Фиксация мазков.** Принцип. Обработка мазков фиксирующими жидкостями, придающими форменным элементам стойкость по отношению к содержащейся в красках воде, которая без фиксации мазков гемолизует эритроциты и изменяет строение лейкоцитов. Кроме того, фиксация, вызывая коагуляцию белка, прикрепляет препарат к стеклу.

Посуда и аппаратура. 1. Пинцет. 2. Специальная посуда для фиксации или стаканы, обрезанные до высоты 6-6,5 см. 3. Штатив для сушки мазков на воздухе. 4. Предметные стекла.

Реактивы. Химический чистый метиловый спирт (метанол) или 96<sup>0</sup> этиловой спирт, или денатурированный спирт, или смесь Никифорова, состоящая из равных количеств этилового спирта и серного эфира. Лучшим фиксатором является метиловый спирт.

Методика. Высохшие на воздухе мазки крови, сложенные попарно (мазками наружу), отпускают пинцетом в специальную посуду для фиксации или в обыкновенные стеклянные стаканы, обрезанные до 6-6,5 см и наполненные до определенной высоты фиксирующей жидкостью. В последнем случае для обеспечения свободного соприкосновения намазанных сторон препаратов с фиксатором сверху, между попарно сложенными мазками, прокладывают предметные стекла, опирающиеся своими ребрами на верхнюю часть стакана. В метиловом спирте мазки выдерживают не менее 5 мин, а в этиловом и денатурированном спирте и смеси Никифорова – не менее 30 мин.

По окончании срока фиксации препараты вынимают пинцетом, сушат на воздухе или ополаскивают в банке с нейтрализованной дистиллированной водой и укладывают мазками кверху на стеклянный мостик для окраски

### **Этап 3. Определение общего количества кровяных пластинки (тромбоциты).**

Для определения количества тромбоцитов предложены прямые методы (в артериальной, венозной или капиллярной крови) и непрямые, основанные на определении количества тромбоцитов на 1000 эритроцитов в мазках периферической крови.

#### **Подсчет количества тромбоцитов**

Подсчет в камере. Принцип. Метод основан на подсчете тромбоцитов в 1 мкл крови при постоянном разведении крови и определенном объеме счетной камеры с использованием фазово – контрастного устройства.

Оборудование. 1. Микроскоп. 2. Фазово – контрастное устройство (КФ). 3. Лампа осветительная к микроскопу (ОИ-7, ОИ-18). 4. Камера Горяева.

Реактивы. 1. 3 г кокаина гидрохлорида, 0,25 г хлорида натрия, 0,025 г фурацилина разводят в 100 мл дистиллированной воды; или 2. 1% раствор оксалата аммония. Раствор кипятят и фильтруют. Хранят в холодильнике.

Получение фазового эффекта – согласно инструкции, прилагаемой в фазово-контрастному устройству.

Ход определения. 0,02 мл крови из пальца помещают в пробирку с 4 мл раствора 1 или 2. оставляют на 25-30 мин для гемолиза эритроцитов. После повторного перемешивания заполняют камеру Горяева, которую помещают во влажную камеру. Через 5 мин подсчитывают тромбоцитов в 25 больших квадратах.

Расчет. Количество тромбоцитов в 1 мкл крови определяют по формуле

$$X = \frac{a * 4000 * 200}{400},$$

где  $a$  – количество тромбоцитов, посчитанных в 400 малых квадратах; 200 – разведение крови; 4000 – множитель, приводящий результат к объему 1 мкл, исходя из объема малого квадрата; 400 – число сосчитанных малых квадратов. Практически подсчитанное число тромбоцитов в 400 малых квадратах умножают на 2000.

**Подсчет в мазках крови (метод Фолио).** Принцип. Метод основан на определении количества кровяных пластинок в окрашенных мазках крови на 1000 эритроцитов.

Оборудование и посуда. 1. Микроскоп. 2. Пробирки длиной 10 см и шириной 1 см. 3. Пипетка от аппарата Панченкова.

Реактивы. 1. 14% раствор натрия сульфата магния. 2. 6% водный раствор этилендиаминотетраацетата натрия (ЭДТА).

Ход определения. Капилляром Панченкова набирают раствор сульфата магния или ЭДТА до метки «75» и вносят в пробирку размером 10x1 см. Туда же вливают кровь, взятую из пальца капилляром Панченкова до метки «0». Содержимое пробирки хорошо перемешивают и из смеси готовят тонкие мазки, которые фиксируют и окрашивают по Романовскому – гимзе.

Расчет. Определяют количество тромбоцитов на 1000 эритроцитов. Вычисляют количество кровяных пластинок в 1 мкл крови, зная абсолютное число эритроцитов в 1 мкл крови.

У взрослых людей количество тромбоцитов в норме составляет 180000-320000 в 1мкл крови.

Примечание. При употреблении в качестве стабилизатора раствора сульфата магния продолжительность окраски составляет 2-3ч, а при употреблении раствора ЭДТА – 30 – 45 мин.

**Метод Альтгаузена.** Принцип метода тот же, что метод Фолио. Реактивы. 1. 14% раствор сульфата магния. 2. Карболовый фуксин Циля. 3. 0,5% водный раствор азура.

Ход определения. На высушенный нефиксированный мазок крови, взятой с магниезией, кладут покровное стекло с небольшой каплей 0,5% водного раствора азура или 10% карболового фуксина. Циля. Тромбоциты окрашиваются уже через 30-60 с. Эритроциты при этом не лизируются, и число тромбоцитов подсчитывают, как и в методе Фолио.

Подсчет тромбоцитов с помощью люминесцентного микроскопа см. в разделе «Люминесцентная микроскопия».

**Прямой метод подсчета в камере без разрушения эритроцитов (ЦОЛИПК).** Принцип. Раствор трилона препятствует свертыванию крови, агрегации и адгезии (прилипанию) тромбоцитов, блокируя кальций, необходимый для этих процессов.

Реактив. Раствор трилона 5% (натриевая соль этилендиаминотетраацета); хранят при 4 под стеклянной или резиновой пробкой.

Ход определения. В пробирку отмеривают 4 мл 5% раствора трилона. Капиллярной пипеткой от гемометра Сали набирают 20 мкл крови, выдувают в пробирку с раствором трилона, закрывают резиновой пробкой и осторожно перемешивают. Заполняют камеру Горяева, оставляют на 5 мин во влажной камере для оседания форменных элементов. Подсчитывают число тромбоцитов в 25 больших квадратах при увеличении в 280-400 раз. Количество тромбоцитов в 1 мкл крови узнают, умножая найденное число на 2000. В этой же камере можно, если надо, подсчитать и эритроциты. При очень большом числе тромбоцитов (более 1000000 в 1 мкл) необходимо развести смесь. При выраженной тромбоцитопении необходимо сосчитать число частичек в пустой жидкости и вычесть эту цифру из результата. Фильтрованная жидкость должна содержать не более 5 частичек на 0,1 мкл раствора.

**Прямой метод с использованием автоматических счетчиков.** Подсчет количества тромбоцитов с помощью различных автоматических счетчиков (Култера, целлоскопа) в большей степени, чем другие прямые методы, увеличивают ошибку вследствие подсчета частичек свернувшейся плазмы, обломков клеток, загрязнения. Наиболее точным является прямой метод без разрушения эритроцитов при взятии пробы из венозной или артериальной крови.

Метод Фолио (и аналогичные непрямые методы) увеличивает ошибку, так как подсчет числа эритроцитов производят из другой капли, однако он незаменим, например, при исследованиях у больных с лейкозом, позволяя отличать тромбоциты от частиц цитоплазмы клеток (клязматоз). У взрослых лошадей количество тромбоцитов составляет 200 000-400 000 в мкл.

Клиническое значение. Количество тромбоцитов подвержены значительным колебаниям в течение суток (снижается в ночные часы).

При тромбоцитопенической пурпуре (болезнь Верьгофа, симптоматическая тромбоцитопения) число тромбоцитов снижается иногда до полного отсутствия.

#### **Этап 4. Проведение биохимического анализа.**

##### **Аминотрансфераза АлАТ (ALT 360)**

Набор реактивов для приготовления 1200 мл рабочих растворов для определения каталитической концентрации аминотрансферазы АлАТ в сыворотке крови. Объем достаточен для 360 анализов.

##### **Принцип метода.**

Аланин – аминотрансфераза (L - аланин; оксоглутарат аминотрансфераза, К. Ф. 2.6.1.2.) катализирует реакцию между L-аланином и 2-оксоглутаратом, в результате которой они превращаются в L-глутамат и соль пировиноградной кислоты. Определение основано на измерении оптической плотности

гидразонов 2- оксоглутаровой и пировиноградной кислот в щелочной среде. Гидразон пировиноградной кислоты обладает более высокой оптической плотностью.

### Реактивы

1. Эталонный раствор натрий пировинограднокислый 2 ммоль/л (3 мл)
2. 2,4-динитрофенилгидразин раствор 1 ммоль/л в HCl 1 моль/л (100 мл)
3. натрий гидроокись (1 флакон)
4. субстрат АлАТ фосфатный буфер 0,1 моль/л, DL-альфа-аланин 0,2 моль/л, 2-оксоглутарат 2 ммоль/л (2 x 50 мл)

Состав инкубационной смеси

Фосфатный буфер pH 7,4 (25 C) 83,0 ммоль/л

DL-альфа-аланин 166,0 ммоль/л

2-оксоглутарат 1,7 ммоль/л

Соотношение сыворотка крови/инкубационная смесь 1/6

Референтные величины

АлАТ (мккат/л) 0,06-0,14

Предельные величины 0,42

Приведенный диапазон референтных значений является ориентировочным. Рекомендуются каждой лаборатории вычислять свои диапазоны нормальных величин.

Вспроизводимость

Около +/- 8%

Вспомогательный реактив (не входит в состав набора)

Физиологический раствор

Приготавливают растворением 0,9 г хлорида натрия в 100 мл дистиллированной воды.

### Приготовление рабочего раствора

Раствор гидроокиси натрия

В мерной колбе вместимостью 1000 мл растворяют в дистиллированной воде содержимое флакона с Реактивом 3.

Устойчивость: раствор устойчив.

### Проведение анализа см. таб.8.

Длина волны (500-5300 нм

Кювета 1 см

Температура (37 +/- 0,1) C

Реактив 4 перед анализом нагревают до (37 +/- 0,1) C.

Таблица 8.

Отмерить (мл)	Проба	Контрольный раствор
---------------	-------	---------------------

Реактив 4	0,25	0,25
Физиологический раствор	-	0,05
Предварительно инкубируют в течение 3 мин при 37 С		
Сыворотка крови	0,05	-
Инкубируют точно 60 мин при 37 С		
Реактив 2	0,25	0,25
Перемешивают и оставляют стоять 20 мин при температуре (с + 15 до +25)С.		
Раствор NaOH	0,50	2,50
Перемешивают и спустя 10 мин измеряют оптическую плотность пробы против контрольного раствора (А).		

### Калибровка

В обозначенные пробирки вносят пипеткой отдельные растворы в вышепроизведенном порядке. После добавления Реактива 2 содержимое пробирок перемешивают и спустя 20 мин добавляют раствор NaOH. Через 10 мин измеряют оптическую плотность раствора №2-5 против раствора №1. строят калибровочный график зависимости оптической плотности от концентрации.

Таблица 9.

Раствор №	Физиол. раствор (мл)	Реактив 4 (мл)	Реактив 1 (мл)	Реактив 2 (мл)	Реактив NaOH (мл)	Конечная кат. конц. (мккат/л)
1	0,10	0,50	-	0,50	5,0	0
2	0,10	0,45	0,05	0,50	5,0	0,28
3	0,10	0,40	0,10	0,50	5,0	0,56
4	0,10	0,35	0,15	0,50	5,0	0,83
5	0,10	0,30	0,20	0,50	5,0	1,11

### Расчет

По оптической плотности пробы (А) на калибровочном графике находят концентрацию фермента.

#### Предупреждение

Пробы сыворотки крови можно хранить даже неделю при (с +2 до +8)С.

При каталитической концентраций ферментов свыше 0,56 мккат/л анализ следует повторить с сывороткой, разведенной физиологическим раствором (результат x разведение).

При кат. концентрации фермента	Разведение
(0,56-0,70)	3x
(0,70-0,80)	5x
(0,80-1,00)	10x
(1,00-1,20)	30x

Повышенное содержание кетовеществ (в сыворотках диабетиков) вызывает завышение каталитической концентрации ферментов АсАТ и АлАТ. В таких случаях необходимо вычесть из оптической плотности пробы (А) оптическую плотность сывороточного контрольного раствора. Сывороточный контрольный раствор приготавливают точно так же, как пробу, с той лишь разницей, что сыворотку добавляют в пробирку после Реактива 2.

Гемолиз повышает кат. концентрацию ферментов АсАТ и АлАТ. Снижение результатов вызывают синтетические моющие средства (сапунаты).

#### **Меры предосторожности.**

Реактив 2 не содержит опасных веществ.

Реактив 3 содержит гидроокись натрия (100%), являющийся едким веществом.

Реактив 4 содержит в низкой концентрации азид натрия являющийся ядовитым веществом.

При работе необходимо соблюдать правила личной гигиены, запрещается есть, пить и курить, надо использовать предохранительные средства.

#### **Оказание первой помощи**

При приеме внутрь следует выпить 0,5 л воды. При попадании в глаза их следует промыть в токе воды. При попадании на кожу ее следует вымыть проточной водой с мылом. Пострадавшему необходимо оказать медицинскую помощь.

#### **Ликвидация мусора.**

Все тестированные пробы считают материалом, который может быть инфицирован, и совместно с возможными остатками реактивов подлежит уничтожению в соответствии с утвержденными внутрибольничными правилами.

Бумажную упаковку сдайте в макулатуру, выполосканыю заводскую тару в сортированный мусор.

### **Инструкция по применению набора реактивов для определения гемоглобина в крови гемиглобинциантным методом.**

#### **Назначение**

Набор предназначен для количественного определения содержания гемоглобина в крови гемиглобинцианидным методом (метод Drabkin) в клинико-диагностических и биохимических лабораториях.

Набор рассчитан на проведение 600 определений при расходе 5,0 мл рабочего раствора на один анализ.

#### **Принцип метода**

Гемоглобин крови при взаимодействии с железосинеродистым калием (красная кровяная соль) окисляется в метгемоглобин (гемиглобин), образующий с ацетонциангидрином гемиглобин-цианид (цианметгемоглобин),

интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации гемоглобина в крови и измеряется фотометрически при длине волны 540 (500-560) нм.

### **Состав набора**

1. Трансформирующий реагент – сухая смесь (натрий углекислый кислый, 1,0 г; калий железосинеродистый, 200 мг) – 3 флакона.
2. Ацетонциангидрид – 3 ампулы (по 0,5 мл).
3. Калибровочный раствор гемоглибина с концентрацией 120 г/л - 1 флакон (2 мл).

### **Аналитические характеристики набора**

Линейная область определения концентрации гемоглабина – в диапазоне от 20 до 200 г/л, отклонение от линейности – не более 2%

Чувствительность определения – не более 10 г/л.

Воспроизводимость: коэффициент вариации не более 2%

Нормальные величины концентрации гемоглобина в крови составляют:

- у мужчин 130-160

- у женщин 120-140

Качество набора можно оценивать с использованием контрольных растворов гемоглобина отечественного или зарубежного производства.

Рекомендуется в каждой лаборатории уточнить диапазон нормальных величин у обследуемого контингента.

### **Меры предосторожности**

При работе с данным набором необходимо соблюдать правила техники безопасности, рекомендуемые при работе с кровью в соответствии с Инструкцией по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебных и профилактических учреждений.

При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки.

В состав трансформирующего раствора на кожу и слизистые необходимо сразу же промыть пораженное место большим количеством проточной воды. Пипетирование категорически запрещается. При попадании внутрь следует немедленно выпить 0,5 л теплой воды вызвать рвоту.

Другие компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

### **Оборудование и реагенты**

- Спектрофотометр, длина волны 540 нм, или фотоэлектроколориметр, длина волны 500-560 нм (зеленый светофильтр), кювета с толщиной поглощающего света слоя 10 мм;
- пипетки, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,05 мл и 5,0 мл;
- колба мерная вместимостью 5-10 мл;
- пробирки вместимостью 5-10 мл;
- секундомер;
- вода дистиллированная;

- перчатки резиновые или пластиковые.

### **Подготовка реагентов для анализа**

Трансформирующий раствор. Один флакон трансформирующего реагента и одну ампулу ацетонциангидрина количественно перенести в мерную колбу вместимостью 1,0 л, растворить в небольшом количестве дистиллированной водой до метки.

Калибровочный раствор гемоглобина готов к применению.

### **Проведение анализа**

В пробирки внести по 5,0 мл трансформирующего раствора, добавить по 0,02 мл крови (разведение в 251 раз), тщательно перемешать и инкубировать при комнатной температуре (+18-25С) в течение 20 минут, после чего измерить величину оптической плотности опытных проб против холостой пробы (трансформирующего раствора) при длине волны 540 (500-560) нм в кювете с толщиной поглощающего света слоя 10 мм.

Калибровочный раствор гемоглобина обрабатывать так же, как и пробу цельной крови.

Окраска устойчива в течение 1 часа.

Концентрацию гемоглобина в крови рассчитать по формуле:

$$C = \frac{E_0}{E_k} * 120 ;$$

где: С – концентрация гемоглобина в опытной пробе, г/л

$E_0$  - оптическая плотность опытной пробы, ед.опт.плотн.;

$E_k$  - оптическая плотность калибровочной пробы, ед.опт.плотн.;

120 – концентрация гемоглобина в калибровочном растворе, г/л.

### **Условия хранения и эксплуатации набора**

Набор должен храниться в упаковке предприятия – изготовителя при температуре +2-8 °С не более 5 суток.

Срок годности набора – 2 года.

Трансформирующий раствор должен быть прозрачным, желтого цвета и может храниться в посуде из темного стекла при комнатной температуре не более 6 месяцев. При появлении осадка или при обесцвечивании раствор непригоден для употребления. Не замораживать!

Калибровочный раствор гемоглобина после вскрытия флакона может храниться в течение 6 месяцев, но не более срока годности набора, при хранении в укупоренном виде при температуре +2-8 °С.

### **Инструкция по применению набора реактивов для определения общего белка в сыворотке и плазме крови биуретовым методом**

#### **Назначение**

Набор предназначен для количественного определения содержания общего белка в сыворотке или плазме крови в клинико-диагностических и биохимических лабораториях.

Набор рассчитан на 400 определений при расходе 5,0 мл рабочего раствора биуретового реагента на один анализ.

### **Принцип метода**

Ионы меди в щелочной среде взаимодействуют с пептидными связями белков сыворотки крови с образованием комплекса красного цвета, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации общего белка и измеряется фотометрически при длине волны 540 (500-560) нм.

### **Состав набора**

1. Биуретовый реагент, концентрат (медь серноокислая – 120 ммоль/л, калий йодистый – 300 ммоль/л, калий-натрий винноокислый – 320 ммоль/л, натрия гидроксид – 3 моль/л) – 1 флакон (100 мл).
2. Калибровочный раствор общего белка (раствор бычьего сывороточного альбумина с концентрацией 60г/л с добавлением хлористого натрия 9 г/л и азида натрия 1 г/л) – 2 флакона (по 2 мл).

### **Аналитические характеристики набора**

Линейная область определения концентрации общего белка – в диапазоне от 20 до 120 г/л, отклонение от линейности – не более 3%.

Чувствительность определения – не более 10 г/л.

Воспроизводимость: коэффициент вариации не более 3%.

Нормальные величины концентрации общего белка в сыворотке (плазме) крови.

### **Меры предосторожности**

При работе с данным набором необходимо соблюдать правила техники безопасности, рекомендуемые при работе с кровью в соответствии с «Инструкцией по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебных и профилактических учреждений».

При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять или передавать вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

Биуретовый реактив содержит щелочь, едкое вещество. В случае попадания раствора на кожу и слизистые необходимо сразу же промыть пораженное место большим количеством проточной воды. При попадании внутрь следует немедленно выпить 0,5 л теплой воды и вызвать рвоту.

Другие компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

### **Оборудование и реактивы**

- Спектрофотометр, длина волны 540 нм, или фотоэлектроколориметр, длина волны 500-560 нм (зеленый светофильтр), кювета с толщиной поглощающего света слоя 10 мм;
- пипетки, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,10 мл и 5,0 мл;
- колба мерная вместимостью 5-10 мл;

- секундомер;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые.

### Анализируемые образцы

Негемолизированная сыворотка или плазма крови.

### Подготовка реактивов для анализа

Рабочий раствор биуретового реагента. Концентрат биуретового реагента развести дистиллированной водой в соотношении 1:19 (содержимое флакона – на 2 л раствора).

Калибровочный раствор общего белка готов к применению.

### Проведение анализа

В Пробирки внести реактивы по следующей таблице 9:

Отмерить, мл	Опытная проба	Калибровочная проба	Контрольная (холостая) проба
Сыворотка (плазма) крови	0,10	-	-
Калибровочный раствор общего белка	-	0,10	-
Вода дистиллированная	-	-	0,10
Рабочий раствор биуретового реагента	5,00	5,00	5,00

Примечание: При использовании кювета другого объема расхода реактивов может быть пропорционально изменен с сохранением соотношения объема образца к объему рабочего раствора 1:50.

Содержимое пробирок тщательно перемешать, избегая образования пены, инкубировать при комнатной температуре (+18-25 °С) в течение 30 минут, после чего измерить величину оптической плотности калибровочной и опытных проб против контрольной (холостой) пробы при длине волны 540 (500-560) нм в кювете с толщиной поглощающего света слоя 10 мм.

Окраска устойчива в течение 1 часа.

### Расчеты

Концентрацию общего белка рассчитать по формуле:

$$C = \frac{E_o}{E_k} * 60,$$

где: С – концентрация общего белка в опытной пробе, г/л;

$E_o$  - оптическая плотность опытной пробы, ед.опт.плотн.;

$E_k$  - оптическая плотность калибровочной пробы, ед.опт.плотн.;  
60 – концентрация общего белка в калибровочном растворе, г/л.

### **Условия хранения и эксплуатация набора**

Набор должен храниться в упаковке предприятия- изготовителя при температуре +2-8 С в течение всего сорока годности. Допускается хранение наборов при температуре до +25 С не более 5 суток.

Срок годности набора – 2 года.

Рабочий раствор биуретового реактива может храниться в темном месте в плотности укупоренной пластиковой посуде при комнатной температуре (+18-25 С) в течение 1 года.

Биуретовый реактив концентрат после вскрытия флакона может храниться в укупоренном виде при температуре +2-8 С в течение всего срока годности набора.

Калибровочный раствор общего белка после вскрытия флакона может храниться в укупоренном виде при температуре +2-8 С в течение 6 месяцев, но не более сорока годности набора.

При концентрации общего белка выше, чем 120 г/л, исследуемый образец необходимо развести дистиллированной водой в соотношении 1:1, повторить анализ и полученный результат умножить на 2.

### **Набор реактивов для определения концентрации общего холестерина в сыворотке и плазме крови энзиматическим колориметрическим методом.**

Настоящий набор реактивов относится к серии «Витал-Европа».

#### **Принцип метода:**

При гидролизе эфиров холестерина холестероэстеризой образуется свободный холестерин. Образовавшийся и имеющийся в пробе холестерин окисляется кислородом воздуха под действием холестеролоксидазы с образованием эквимольного количества перекиси водорода. Под воздействием пероксидазы (POD) перекись водорода окисляет хромогенные субстраты с образованием окрашенного продукта. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации холестерина в пробе.

#### **Исследуемый материал:**

Свежая сыворотка и плазма крови.

Состав набора:

№1. Буфер

Фосфатный буфер 100 ммоль/л

Фенол 20 ммоль/л

детергенты, активаторы и стабилизаторы

№2. Лиофилизат

Конечные концентрации в растворе:

Холестероэстераза 400 U/л

Холестеролоксидаза 250 U/л

POD 500 U/л

хромогены, активаторы и стабилизаторы.

№3. Стандартный раствор холестерина:

Холестерин 5,17 ммоль/л (200 мг/100 мл)

**Аналитические характеристики набора:**

Линейность до 25,8 ммоль/л (1000 мг/100 мл).  
Значение коэффициента вариации не более 5%  
Время инкубации 20-25 С – 10 мин; 37 С – 5 мин.  
Чувствительность 0,5 ммоль/л  
Стабильность окраски не менее 2 часов.

**Подготовка реагентов к процедуре анализа и их стабильность:**

Рабочий реагент: Содержимое флакона №2, аккуратно перемешивая, растворить во флаконе №1. Для получения оптимальных результатов рекомендуется выдержать рабочий реагент после полного растворения лиофилизата при комнатной температуре 20-30 мин. Полученный реагент стабилен не менее 6 месяцев при 2-4 С. Реагент №3 готов к работе. Плотно закрывайте флакон сразу же после использования. Невскрытые реагенты №1-3 стабильны не менее 12 месяцев при температуре 2-4 С в темноте. Дата изготовления, серия и каталожный номер указаны на упаковке.(см. таб.10)

**Анализ таб.10.**

Реагент	Опытная проба, мл	Калибровочная проба, мл	Контрольная проба, мл
Сыворотка или плазма	0,02	-	-
Вода	-	-	0,02
Реагент	2,0	2,0	2,0
Раствор холестерина	-	0,02	-

Реакционную смесь тщательно перемешивают и инкубируют не менее 5 минут при комнатной температуре (20-25 С) или при 37 С и измеряют оптическую плотность опытной и калибровочной проб против контрольной пробы в кюветах с толщиной поглощающего слоя 5 мм (1 см) при длине волны 500 нм (ФЭК – 490 нм). Окраска стабильна не менее 2 часов после инкубации при предохранении от прямого солнечного света.

Расчет концентрации холестерина проводят по формуле:

$C = E_o / E_{ст} \times 5,17$  (ммоль/л) или  $C = E_o / E_{ст} \times 200$  (мг/100 мл)

где,  $E_o$  и  $E_{ст}$  – экстинкции образца и стандарта, измеренные относительно контрольной пробы.

Содержание холестерина: идеальное содержание <5,2 ммоль/л,  
допустимое содержание 5,2-6,5 ммоль/л,  
патологическое содержание >6,5 ммоль/л/

**Внимание:**

1. При хранении в холодильнике стандартный раствор холестерина может мутнеть. В этом случае следует нагреть раствор при 35-40 С до исчезновения мутности.
2. При выпадении незначительного осадка детергентов в буферном растворе интенсивно взболтайте флакон до исчезновения мутности.
3. Гемоглобин до концентрации 200 мг/100 мл и билирубин до концентрации 5 мг/100 мл не влияют на правильность определения холестерина.
4. При мытье посуды для анализа и кювет для измерения нельзя пользоваться моющими растворами, содержащими перекись водорода, а также серный (диэтиловый) эфир (например, смесью Никифорова).

### **Мочевина Ферментативно**

(UREA 200 ENZ)

Набор реактивов для приготовления 900 мл рабочих растворов для 200 определений мочевины в мочи и в сыворотке.

#### **Принцип метода**

Уреаза гидролизует мочевины с образование аммиака и двуокиси углерода. Возникший аммиак определяют по цветной реакции салицилата со щелочным раствором гипохлорида.

#### **Реактивы**

1. Буфер – фермент (1 флакон)  
5,5-диэтилбарбитурат натрия 1,11 ммоль  
ЭДТА 3 1,24 ммоль, уреазы 8 /флакон  
Азид натрия 12,5%
2. Салицилат натрия (1 флакон)  
0,014 моль/флакон
3. Нитропруссид натрия (1 флакон)  
1,8 ммоль/флакон
4. Гидрохлорит натрия (20 мл)  
гидрохлорид натрия 0,2 моль/л,  
гидроокись натрия 3 моль/л
5. Стандартный раствор,  
Мочевина 15 ммоль/л (10 мл)

#### **Состав реакционной смеси**

Буфер барбиталовый	2,6 ммоль/л
Уреаза	8,85 мккат/л
Салицилат натрия	170 ммоль/л
Нитропруссид натрия	1,8 ммоль/л
Гидрохлорид натрия	4,4 ммоль/л
Гидроокись натрия	66 ммоль/л
Соотношение сыворотка/реакционная смесь	1/226

### Референтные величины

(нтБ)С – Мочевина (моль/л) 2,61-8,35

сутМ – Мочевина (ммоль) 330-590

Приведенный диапазон референтных значений является ориентировочным. Рекомендуются каждой лаборатории вычислять свои диапазоны нормальных величин.

### Приготовление раствора

Раствор фермента в буфере: Содержимое флакона 1 растворяют в 100 мл дистиллированной воды.

Устойчивость: не менее 10 дней (с +2 до +8) С.

Раствор нитропруссиды: Содержимое флаконов 2 и 3 растворяют в 400 мл дистиллированной воды.

Устойчивость: не менее 14 дней (с +2 до +8)С в темноте.

Раствор гидрохлорита: Содержимое флакона 4 разбавляют дистиллированной водой до 400 мл.

Устойчивость: не менее 1 месяц (с +2 до +8)С

### Проведение анализа

Длина волны (540-560) нм

Кювета 1 см

Температура инкубации (37 +/- 0,1) С  
реакции (с +15 до +25)С

Таблица 11.

Отмерить (мл)	Проба	Стандарт	Раствор сравнения
Сыворотка	0,02	-	-
Реактив 5	-	0,02	-
Раствор фермента в буфере	0,50	0,50	0,50
Перемешивают и инкубируют 10 мин при 37С			
Раствор нитропруссиды	2,0	2,0	2,0
Раствор гидрохлорита	2,0	2,0	2,0
Немедленно по добавлении Раствора гидрохлорита перемешивают, через 15 мин (25С) снова перемешивают и измеряют оптическую плотность пробы ( $A_1$ ) и стандарта ( $A_2$ ) против раствора сравнения.			

Вычисление:

$$(\text{нТБ})\text{С-Мочевина (моль/л)} = 15 \cdot \frac{A_1}{A_2}$$

### **Примечания**

Мочу разводят дистиллированной водой 1+99 (результат  $\times 100$ ). У проб с содержанием мочевины свыше 33 ммоль/л анализ повторяют с пробой, разведенной водой 1+1 (результат  $\times 2$ ).

### **Меры предосторожности**

Реактив 1 содержит азид натрия (12,5%), являющийся высокоядовитым веществом и диэтилбарбитурат натрия (20%), являющийся психотропическим веществом.

Реактив 3 содержит нитропруссид натрия (100%) – ядовитое вещество. Реактив 4 содержит гидроокись натрия (12%) – едкое вещество.

При работе необходимо соблюдать правила личной гигиены, запрещается есть, пить и курить, надо использовать предохранительные средства.

### **Оказание первой помощи**

При приеме внутрь следует выпить 0,5 л воды. При попадании в глаза их следует промывать минимально 10 мин в токе воды. При попадании на кожу ее следует вымыть проточной водой. Пострадавшему должна быть оказана квалифицированная медицинская помощь.

### **Ликвидация мусора**

Все тестированные пробы считают материалом, который может быть инфицирован, и совместно с возможными остатками реактивов подлежит уничтожению внутрибольничными правилами.

## **Определение количества билирубин С в крови.**

Набор реактивов для 100 определений билирубина в сыворотке крови.

### **Принцип метода**

Билирубин вступает в реакцию азосочетания с диазотированной сульфаниловой кислотой с образованием раствора азокрасителя, который фотометрируют.

Определение общего (неконъюгированного и прямого) билирубина проводят в растворе акцелератора, определение прямого (конъюгированного) билирубина – без акцелератора.

### **Реактивы**

1. Сульфаниловая кислота раствор 30 ммоль/л  
в растворе хлористоводородной кислоты 150 ммоль/л (60 мл)

2. Буферный раствор натрий-калий виннокислый  
0,93 моль/л в растворе натрия гидроокись 1,9 моль/л (120 мл)
3. Акцелератор кофеин бензойнокислый 0,52 моль/л (120 мл)
4. Натрий азотистокислый раствор 0,025 моль/л (10 мл)
5. Эталон билирубина для приготовления  
раствора а мкмоль/л (1 флакон)
6. Альбумин для приготовления раствора 20 г/л (1 флакон)

#### Состав реакционной смеси

Сульфаниловая кислота	2,50 ммоль/л
Хлористоводородная кислота	12,50 ммоль/л
Натрий бензойнокислый	0,22 моль/л
Натрий-калий виннокислый	0,39 моль/л
Кофеин	0,11 моль /л
Натрия гидроокись	0,16 моль/л
Соотношение сыворотка/реакционная смесь	1/12

#### Референтные величины

Общий билирубин (мкмоль/л) до 20,5

Прямой билирубин (мкмоль/л) до 5,1

Приведенный диапазон референтных значений является ориентировочными. Рекомендуется каждой лаборатории вычислять свои диапазоны нормальных веществ.

#### Воспроизводимость

Около +/- 4%

Вспомогательный раствор (не входит в состав набора)

Физиологический раствор приготавливают растворением 0,9 г хлорида натрия в 100 мл дистиллированной воды.

### Проведение анализа

Пробы следует предохранять от прямого света!

#### Определение общего билирубина

Длина волны (580-620) нм, кювета 1 см, температура (с +15 до +25)<sup>0</sup>С.

Таблица 12. проведение анализа.

Отмерить (мл)	Контрольный раствор 1	Контрольный раствор 2	Проба
Реактив 1	0,20	0,20	0,20
Реактив 4	0,05	-	0,05
Реактив 3	1,00	1,00	1,00
Физиолог.раствор	0,20	0,05	-
Сыворот.крови	-	0,20	0,20
Перемешивают в течение (10-50) мин добавляют			
Реактив 2	1,00	1,00	1,00

Перемешивают и в течение 5-60 мин измеряют оптическую плотность пробы ( $A_1$ ) и контрольного раствора ( $A_2$ ) против контрольного раствора 1.

### **Определение прямого билирубина**

Длина волны (510-550) нм, кювета 1 см, температура (с +15 до +25)<sup>0</sup>С.

Таблица 13. Определение прямого билирубина

Отмерить (мл)	Контрольный раствор 1	Контрольный раствор 2	Проба
Реактив 1	0,20	0,20	0,20
Реактив 4	0,05	-	0,05
Физиолог.раствор	1,20	1,05	1,00
Сыворот.крови	-	0,20	0,20

Перемешивают и в точно через 5 мин измеряют оптическую плотность пробы ( $A_1$ ) и контрольного раствора ( $A_2$ ) против контрольного раствора 1.

Калибровка

Приготовление рабочих растворов для калибровка

### **Раствор билирубина**

Во флакон с Реактивом 5 (билирубин) отмеривают точно 4,00 мл дистиллированной воды, флакон закрывают и его содержимое растворяют, осторожно перемешивая. Раствор содержит точно a мкмоль билирубина/л. При температуре (+2 - +8)<sup>0</sup>С в темноте раствор устойчив примерно 3 дня.

### **Раствор альбумина**

Во флакон с Реактивом 6 (альбумин) отмеривают точно 8,00 мл дистиллированной воды и его содержимое растворяют при осторожном перемешивании. Раствор содержит около 20 г альбумина /л. При температуре (+2 - +8)<sup>0</sup>С раствор устойчив минимально 1 неделю

### **Приготовление калибровочных растворов таблица 14.**

Раствор №	Раствор билирубина <u>a</u> мкмоль/л (мл)	Раствор альбумина (мл)	Конечная концентрация билирубина (мкмоль/л)
1	0,10	1,90	0,050. <u>a</u> .
2	0,25	1,75	0,125. <u>a</u> .
3	0,50	1,50	0,250. <u>a</u> .
4	0,75	1,25	0,375. <u>a</u> .

5	1,00	1,00	0,500. <u>a</u> .
---	------	------	-------------------

a- концентрация билирубина, приведенная на этикетке флакона с Реактивом 5.

С растворами для калибровки работают таким же образом как с пробкой сыворотки и строят калибровочные графики.

Таблица 15.

Отмерить (мл)	Общий билирубин		Прямой билирубин	
	Контрол.раствор	Эталон	Контрол.раствор	Эталон
Реактив 1	0,20	0,20	0,20	0,20
Реактив 4	0,05	0,05	0,05	0,05
Реактив 3	1,00	1,00	1,00	1,00
Калибровоч. раствор	-	0,20	-	0,20
Раствор альбумина	0,20	-	0,20	-
Перемешивают в течение (10-30) мин добавляют				
Реактив 2	1,00	1,00	-	-
Перемешивают и в течение 60 мин измеряют оптическую плотность эталона против раствора сравнения.				

Строят калибровочные графики как зависимость оптической плотности от содержания билирубина в калибровочном растворе в ммоль/л.

Содержание билирубина в пробе отсчитывают по калибровочным графикам, построенных с помощью калибровочных растворов.

#### Расчет

Содержание билирубина в пробе отсчитывают по калибровочным графикам. Для расчета берут разность оптических плотностей пробы и контрольного раствора 2 ( $A_1 - A_2$ ).

#### Предупреждение:

Если оптическая плотность пробы 0,8, сыворотку разводят физиологическим раствором и анализ проводят повторно (результат  $\times$  разведение). Если при анализе не измеряется контрольный раствор 2 (сывороточный слепой опыт), полученные результаты могут быть завышенными даже на (2-14) мкмоль/л, в зависимости от типа сыворотки крови.

#### Меры предосторожности

Реактив 2 содержит гидроокись натрия являющийся едким веществом.

#### Оказание первой помощи

При приеме внутрь следует выпить 0,5 л воды. При попадании в глаза их следует промывать минимально 10 мин в токе воды. При попадании на кожу ее

следует вымыть проточной водой. Пострадавшему должна быть оказана квалифицированная медицинская помощь.

### **Ликвидация мусора**

Все тестированные пробы считают материалом, который может быть инфицирован, и совместно с возможными остатками реактивов подлежит уничтожению внутрибольничными правилам.

### **1.2.3 Получение результаты собственных исследований.**

Результаты биохимического анализа: 1000 гр.

1. Общий белок – 56 г/л
2. Альбумин – 48 %
3. Глобулин – 52 %
4. Гемоглобин – 136 г/л
5. Сахар крови – 6,3 мм/л
6. Холестерин – 1,76 ммоль/л
7. Остаточный азот – 31,9 ммоль / л

8. Билирубин общий – 14,3 мм/л
9. Билирубин прямой – 1,6 мм/л
10. Диастаза – 54 ед.
11. Мочевина – 9,4 ммоль/л
12. Тимоловая проба – 0,2 ед.
13. АсАТ – 2,04 ммоль/л
14. АлАТ – 1,58 ммоль/л

#### Результаты клинического анализа:

1. Эритроциты  $4,5 \cdot 10^6$  г/л
2. Лейкоциты  $6,4 \cdot 10^6$  г/л
3. Тромбоциты  $252 \cdot 10^6$  г/л
4. Лейкоцитратные формы

В таблице № 16 приведена сравнительные данные анализа.

Таблица № 16 Результаты клинического анализа.

Животное	Эритроциты	Лейкоциты	Тромбоциты
	Количество в $1\text{мм}^3$ , млн.	Количество в $1\text{мм}^3$ , тыс.	Количество в $1\text{мм}^3$ , тыс
Лошадь «Мустанг»	$4,5 \cdot 10^6$ г/л	$6,4 \cdot 10^6$ г/л	$252 \cdot 10^6$ г/л
Справочные данные	8-10 мили	8-11 мил	От 200 до 600

Исследования биохимического свойства крови лошади показала, что она состоит из одних и тех же веществ количества которых меняется довольно значительно. Результаты показаны выше.

По результатам проведенных исследований можно сделать выводы что биологическая ценность крови ниже. Как мы знаем что биологическая и пищевая ценность крови зависит от породы, от упитанности, от вида, пола.

Поэтому по результатам исследований можно сравнить биологического свойства крови лошади по их породам. См. таблица 17.

Таблица 17. Определение биохимического свойства крови лошади.

Биохимические анализы	Содержание составных частей (в.г) в 1000 г цельной крови.	
Состав крови лошади.	Результаты собственного исследований.	Справочные данные
1   Общий белок.	56 г/л	236

2	Альбумин	48 %	36,1 %
3	Глобулин	52 %	29 %
4	Гемоглобин	136 г/л	167 г/л
5	Сахар	6,3 мм/л	0,526 мм/л
6	Остаточный азот	31,9 мг / л	30-58 мг/%
7	Общ. билирубин	1,43 мг/ %	0,2-0,5 мг/%
5	Прямой билирубин	1,6 мг/%	0,2-0,4 мг/%
6	Диастаза	54 ед.	
7	Мочевина	9,4 ммоль/л	20-60 мг/%
6	АсАТ	2,04 ммоль/л	
7	АлАТ	1,58 ммоль/л	

Таким образом результаты исследований и анализ биохимических свойств крови лошади подтверждают возможность использования ее в производстве пищевых изделий и в получении лечебных препаратов.

В результате проведенных исследований можно сделать заключение что качества получаемых продуктов зависит от биохимического свойства крови. Если биохимические свойства подходит к норме то, биологическая и пищевая ценность продукта будет высоким.

### **3.Раздел. Заключение**

Перед мясной промышленностью Республики Казахстан стоит задача увеличения производства мясной продукции, улучшение ее качества за счет сокращения потерь, изыскания новых источников сырья и совершенствования технологии переработки с целью создания продуктов высокой биологической и пищевой ценности.

Важным резервом увеличения мясных ресурсов является комплексное использование продуктов убоя скота за счет создания и освоения производства

комбинированных мясопродуктов, включая крови убойных животных и сырья растительного происхождения.

Химический состав и биологические свойства крови обуславливают высокую ценность ее как сырья для производства разнообразных мясных продуктов.

У нас в Казахстане имеются большие потенциальные возможности, увеличить общий объем производства мясных продуктов из крови лошади, а также продуктов его переработки. Требуется расширение ассортимента и повышения мясных продуктов, в том числе мясных продуктов, пользующихся большим спросом у населения.

Развитие массового питания в Казахстане в условиях рыночных отношений непосредственно связана с решением таких задач как;

- повышение качества выработанных продукций.
- переход на лабильных ассортимент мясных продуктов с учетом запросов потребителей,
- разработка рецептур и технологий новых видов продуктов с своеобразными либо уникальными органолептическими показателями при использовании нетрадиционных видов сырья.

Исследованиями крови убойных животных занимались ряд отечественных и зарубежных ученых: Жаринов А.И., Крылов Н.Н., Рогов И.А., Мицин Б.Е., Пожарийская Л.С., Тулеуов Е.Т., Чоманов У.Ч. и другие, однако практически все имеющаяся в литературе материалы направлены на использование крови крупного рогатого скота и свиней. Так как в Республике Казахстан значительный удельный вес в переработке убойных животных составляют лошади, вопросы организаций максимального сбора и использования крови последних на пищевых цели имеют больше практическое значения.

Целью и задачей магистерский диссертаций является изучение биохимические свойства лошадиной крови в производстве пищевых продуктов. Биохимические свойства крови лошади является важнейшим фактором в производстве пищевых продуктов. Поэтому вначале было изучение биохимического свойства крови. Для того чтобы изучить биохимического свойства крови, было проведена исследования. В исследования вошли такие биохимические анализы: определение количества общего белка, альбумин, глобулин, гемоглобин, сахар крови, холестерин и другие. Из результатов анализа мы определяем количества общего белка, альбумин, глобулин, гемоглобин, сахар, диастаза, трансфераза ниже чем определенного норма и это связана с многими факторами.

Это показывает что биологическая и пищевая ценность данного сырья является низким. Биологическая и пищевая ценность крови зависит от многих факторов. Как мы знаем что биологическая и пищевая ценность крови зависит от породы, пола, возраста, вида условия кормления, качества еды.

В результате проведенных исследования можно сделать заключение, что химический состав и биологическая ценность крови меняется от выше указанных факторов. И чтобы получить ценный продукт надо использовать

биологически ценный сырье. А для этого мы должны провести ряд исследований.

#### **Список использованных литератур.**

1. Азин Д.П., Бахарев М.В. Влияние растительных порошков на качество вареных колбас. Хранение и переработка сельхозсырья, 2005, №3, с 47.
2. Антипова Л.В., Глотова И.А., Рогов И.А. Методы исследования мяса и мясных продуктов. – М.: Колос С, 2004- 571 с.
3. Антипова Л.В., Глотова И.А. Основы рационального использования вторичного коллагенсодержащего сырья мясной промышленности.- Воронеж.- 1997.- с. 246.

4. Антипов Л.В. , Солободяник В.С., Сулейманов С.М. Анатомия и гигитология сельскохозяйственных животных – М.: Колос С, 2005- 384 с.
5. Амирханов К.Ж. Производства комбинированных полуфабрикатов. Обзорная информация, 1999
6. Анатомия пищевого сырья. – Учебно – методические указания г. Воронеж. Составитель – канд.ветеринарных наук, ст. преподаватель Крупицын В.В. Рецензент – канд. с-х наук, доцент Байлова Н.В. 2004.- 23
7. А.С.Большаков, Л.М.Рейн, Н.П.Янушкин. Технология мяса и мясопродуктов. - М.: «Пищевая промышленность», 1976г. - 398 с.
8. Технология мяса и мясопродуктов/ Л.Т.Алехина, А.С.Большаков, В.Г.Боресков и др.; Под ред. И.А.Рогова. - М.: Агропромиздат, 1988. - 576 с., ил. - (Учебники и учебные пособия для студентов высших учебных заведений).
9. Гаптар С.Л. Разработка технологии формованного мясопродукта из конины с использованием многокомпонентного рассола. Автореферат на соиск. учен. степени канд. техн. наук. РК Семипалатинск., 2002-29 с.
10. Горфункель И.И. Товароведения мясных, рыбных, молочных и жировых товаров. М.: Пищевая промышленность, 1999- 521 с.
11. Козеева О.В. Обработка плазмы крови убойных животных биотехнологическим способом. М.: Теоретический журнал. Хранение и переработка сельхозсырья. № 1.- 2002. Месхи А.И. Биохимия мяса, мясопродуктов и птицепродуктов. - М.: «Легкая и пищевая промышленность», 1984г. - 280 с.
12. Методы исследования мяса и мясных продуктов. - М.: КолосС, 2004. - 571 с.: ил. - (Учебники и учебные пособия для студентов высших учебных заведений).
13. Мурусидзе Д.Н. Технология производства продукции животноводства М.: КолосС 2005, 432 с.
14. Макаров В.А. Ветеринарно – санитарная экспертиза с основами технологии и стандартизации продуктов животноводства. М.: Агропромиздат, 1991- 453 с.
15. Ратушный А.С. Применение ферментов для обработки мяса. - М.: Издательство «Пищевая промышленность», 1976.
16. Интернет (<http://www.meat.ru/global/view.asp?id=192>)
17. Некоторые аспекты переработки крови убойных животных. М.: Пищевая промышленность 1995, № 1- 25 с.
18. Пожарская Л.С., Либерман С.Г., Горбатов В.М. Кровь убойных животных и ее переработки. М.: Колос С, 1991 – 500 с.
19. П.Е.Павловский, В.В.Пальмин. Биохимия мяса. - М.: «Пищевая промышленность», 1975г. - 343 с.

20. Соколов А.А. Физико-химические и биохимические основы технологии мясопродуктов. М., «Пищевая промышленность», 1965, 490 с.
21. Судаков Н.В. Переработка и использовании крови убойных животных. М.: Пищевая промышленность. 1989- 469 с.
22. Рогов И.А. Технология мяса и мясных продуктов. М.: КолосС,-1987-540
23. Тулеуов Е.Т. Разработка технологии комплексного использования конины и продуктов ее убоя с применением биотехнологических и физических методов обработки. Автореферат диссертация д. техн. наук. Кемерово 1999.
24. Уразбаев Ж.З. Разработка технологии использования цельной крови лошади в производстве комбинированных вареных колбасных изделий. Автореферат на соиск. учен. степени канд. техн. наук. Семипалатинск., 1996 – 16 с.