**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕНЗЕНСКОЙ ОБЛАСТИ**  
  
**ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НЕТИПОВОЕ ОБЩЕОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  ПЕНЗЕНСКОЙ ОБЛАСТИ**

**«ГУБЕРНСКИЙ ЛИЦЕЙ»**

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОГО КОЛЛАГЕНОВОГО МАТРИКСА НА ОСНОВНЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ СЫВОРОТКИ КРОВИ КРЫС НА РАЗНЫХ СРОКАХ ПОСЛЕ ИМПЛАНТАЦИИ**

**Выполнила**: учащаяся

9 химико-биологического класса

Кривошеева Полина

**Научный руководитель**: старший методист Центра информатизации образования Ерофеева Светлана Николаевна

**Научный консультант:** инженер – исследователь ООО «НаноМед»

Кручинина Анастасия Дмитриевна

**Пенза, 2019**

**Содержание**

Введение……………………………………………………………………………..........................3

Глава 1.Обзор литературы………………………………………………………………………….4

* 1. Что такое окклюдер………………………………………………………….......................4
  2. Проведение операции……………………………………………………………………….4
  3. Основные биохимические параметры сыворотки крови…………………………………6

Глава 2. Материалы и методы исследования……………………………………………………10

2.1. Материалы исследования…………………………………………………………………….10

2.2.Моделирование эксперимента подкожной имплантации

материала…………………………………………………………………………………………...10

2.3. Метод определения аспартатаминотрансферазы (АСТ)………………………………….11

2.4. Метод определения щелочной фосфатазы (ЩФ)………………………….........................13

2.5. Метод определения аланинаминотрансферазы (АЛТ)……………………………………..14

2.6. Метод определения Ɣ-глутамилтрансферазы (гамма-ГТ)…………………………………16

2.7. Метод определения альбумина………………………………………………………………17

2.8. Метод определения креатинина……………………………………………………………...18

2.9. Метод определения общего белка…………………………………………………………...19

2.10. Метод определения фосфора неорганического……………………………………………19

2.11. Метод определения холестерина общего………………………………………………….20

2.12. Метод определения хлоридов………………………………………………………………21

2.13. Метод определения калия…………………………………………………..........................22

2.14. Метод определения кальция………………………………………………………………...23

2.15. Метод определения натрия…………………………………………………………………23

2.16. Метод определения билирубина……………………………………………………………24

2.17. Метод определения мочевины……………………………………………………………...25

2.18. Метод определения глюкозы………………………………………………........................26

2.19. Метод определения триглицеридов………………………………………………………...27

Глава 3. Результаты и их обсуждение……………………………………………………………29

Заключение…………………………………………………………………………………………35

Литература…………………………………………………………………………………………36

**Введение**

Как показали статистические исследование приблизительно у 20% детей, имеющих дефект межпредсердной перегородки, к возрасту 2 лет дефект закрывается самостоятельно без проведения лечения. В случаях если самостоятельного закрытия ДМПП не происходит, обычно предпринимают оперативное лечение, поскольку дальнейшее сохранение дефекта чревато формированием утолщения стенок легочной артерии и легочной гипертензии. Если своевременно не прибегнуть к лечению ДМПП, возможен риск неблагоприятного исхода увеличивается на 25% Первый этап лечения ДМПП обычно проводится  кардиологом.

У операции эндоваскулярного закрытия ДМПП есть несколько преимуществ перед традиционной открытой операцией, что делает ее все более востребованной и используемой в качестве альтернативы. Прежде всего,эндоваскулярное лечение дефекта межпредсердной перегородки не требует выполнения широкого травматичного доступа и использования во время операции аппарата искусственного кровообращения. Как результат это приводит к снижению сроков пребывания в больнице, отсутствию больших рубцов после операции, сокращает сроки выздоровления и реабилитации. После эндоваскулярного закрытия ДМПП человек остается в стационаре на одни, максимум двое суток, и в течение 1-2 недель происходит его полное восстановление и возвращение к обычному режиму активности.

В основе процедуры эндоваскулярного лечения лежит своеобразное закупоривание патологического сообщения между предсердиями специальным устройством, которое носит название окклюдера.

Компанией «НаноМед» предложена идея имплантации мембраны окклюдера из биологического материала на основе подслизистой тонкой кишки свиньи.

Однако комплексное исследование этого материала в качестве мембраны проведено не было, а одним из ключевых этапов является оценка общетоксического действия, в которую входит оценка биохимических параметров после имплантации медицинского изделия или материала для этого изделия.

Цель – изучить влияние внеклеточного коллагенового матрикса на биохимические параметры сыворотки крови крыс на разных сроках после имплантации.

Задачи:

1. Изучить литературные источники по данной теме.
2. Изучить технику безопасности при работе в химической лаборатории, а так же при работе с реактивами и оборудованием.
3. Изучить технику работы с лабораторными животными.
4. Провести подкожную имплантацию материала.
5. Провести забор крови крыс через 2 и 4 недели после имплантации.
6. Определить биохимические параметры сыворотки крови.
7. Оценить влияние внеклеточного коллагенового матрикса на значение биохимических параметров.

**Глава 1. Обзор литературы**

* 1. **Что такое окклюдер?**

Уже более трех десятилетий многие пороки сердца лечат хирургическим путем, ушивая врожденные дефекты хирургической нитью и специальными заплатами. При операциях на открытом сердце хирург, чтобы получить доступ к проблемному месту, должен раскрыть грудную клетку пациента и само сердце. Кровь по организму во время операции на открытом сердце качает аппарат искусственного кровообращения (АИК).

В 1977 году впервые была предпринята попытка исправить дефекты структур сердца другим способом: с помощью специального устройства – окклюдера, который также является «заплаткой», но проводится к дефекту через сосуд в свернутом виде и, расправляясь в нужном месте, полностью и навсегда закрывает дефект. Эксперименты на животных закончились успешно и дали хорошие результаты. Благодаря этому, ученые под руководством американского профессора КюртаАмплатца и детского кардиолога из Чехословакии Йозефа Машуры создали транскатетерную систему – окклюдер из никель-титанового сплава.

Окклюдер представляет собой «заплатку», состоящую из двух дисков нитинола (сплав элементов титана и никеля, обладает эффектом памяти формы), соединенных между собой перешейком, который соответствует размеру дефекта.

Диаметр дисков больше диаметра перешейка, что способствует крепкой фиксации системы на тканях с дефектом. Окклюдер изготовлен из никель-титанового сплава (нитинола), который не вступает в реакцию с кровью и не отторгается организмом. Изнутри устройство заполнено биологическим или синтетическим материалом, дополнительно закрепляющим «заплатку» в нужном месте и прочно закрывающем дефекты структур сердца, чтобы не было «протечки». Окклюдеры имеют различную форму и размеры, соответственно виду порока и величине дефекта, который они должны закрыть.

Мембрана окклюдера может быть двух видов:

1. Биологический;
2. Синтетический.

Синтетический материал дает некоторые минусы: низкая способность к биоинтеграции, высокая степень кальцификации, не способен повторить пространственную структуру биологической ткани.

Преимущества биоматериала на основе ПТК(подслизистой тонкой кишки): биодеградация, гемостатическая способность, высокая биоинтеграция.

Подслизистая основа тонкой кишки является естественным кишечным образованием, обладает достаточной плотностью и прочностью, ее толщина составляет приблизительно 0,05 – 0,22 мм. Подслизистый слой имеет переменную пористую структуру с порами от 20 до 30 мкм, что способствует диффузии кислорода, необходимого для поддержания пролиферации и жизнеспособности клеток.

* 1. **Проведение операции**

Врожденный дефект межпредсердной перегородки появляется у ребенка, когда он находится в матке. Способствуют этому такие факторы:

* наследственная предрасположенность;
* прием препаратов содержащих литий, прогестерон, третиноин;
* перенесенные во время беременности болезни: [краснуха](http://www.polismed.com/subject-krasnukha.html), [эпидемический паротит](http://www.polismed.com/subject-svinka-ehpidemicheskijj-parotit.html), вирус Коксаки;
* [сахарный диабет](http://www.polismed.com/subject-sakharnyjj-diabet.html) у матери;
* [алкоголизм](http://www.polismed.com/subject-alkogolizm.html) матери приводит к тому, что 50% детей рождаются с пороками сердца.

Эти причины могут вызвать 3 вида дефектов межпредсердной перегородки:

1.Открытое овальное окно(ООО). У всех детей в период внутриутробного развития есть отверстие между предсердиями – овальное окно. Оно необходимо ребенку до тех пор, пока его легкие не дышат самостоятельно. После рождения это отверстие закрывается специальным клапаном, который через несколько месяцев плотно прирастает к межпредсердной перегородке.

2.Дефект в нижней части перегородки - первичный. Отверстие находится в нижней части перегородки над клапанами, которые соединяют предсердия с желудочками. Иногда порок захватывает и сами клапаны, и их створки становятся слишком маленькими, чтобы выполнять свои функции.

3.Дефект в верхней части перегородки - вторичный. Соединяют между собой верхние отделы предсердий. Обычно они связаны с аномалиями верхней полой вены.

Материалы, из которых сделанокклюдер, полностью биосовместимые и гипоалергенные, не имеют магнитных свойств. Эндоваскулярное вмешательство выполняется в условиях рентгеноперационной. Перед проведением операции эндоваскулярного закрытия дефекта межпредсердной перегородки всем пациентам проводится транспищеводное ультразвуковое исследование сердца (УЗИ). Поскольку наше сердце располагается непосредственно за пищеводом, транспищеводное УЗИ дает полную информацию об анатомии такого порока сердца.

Только этот метод диагностики позволит точно определить показания и противопоказания к эндоваскулярному лечению. Транспищеводный датчик у большинства пациентов вызывает дискомфорт, поэтому операция закрытия дефекта межпредсердной перегородки окклюдером проводится под наркозом. Ни разреза грудной клетки, ни использования аппарата искусственного кровообращения при этом не требуется.

Затем через прокол вены на бедре окклюдер в «упакованном» виде, по ходу естественных сосудов вводится в полости сердца, под контролем рентгеноскопии и эхокардиографии устанавливается таким образом, что один из его дисков располагается в левом предсердии, другой – в правом предсердии. Дефект оказывается полностью закрыт заплаткой, которая исключает сброс крови из левого предсердия в правое.

Если окклюдер установлен правильно, катетер отсоединяется и извлекается наружу, если произошло смещение, окклюдерможет быть снова втянут в доставляющий катетер и процесс установки повторится. Продолжительность вышеописанной процедуры, включая подготовку пациента - около часа. Через сутки после операции проводится контрольное обследование и пациента выписывают. После выписки пациент находится под наблюдением кардиохирурга, с периодичностью сначала в один, затем в три месяца выполняется эхокардиография для контроля положения окклюдера и герметичности межпредсердной перегородки. На сегодняшний день более чем у 90% пациентов дефект межпредсердной перегородки может быть устранен при помощи эндоваскулярной операции. В то же время имеются противопоказания. Это огромные дефекты без краев, что делает невозможным надежную фиксацию окклюдера, наличие у пациента других внутрисердечных аномалий (часто это бывает аномальный дренаж одной или нескольких легочных вен), требующих хирургической коррекции. Отсутствие аортального края или аневризма перегородки не являются противопоказаниями к эндоваскулярному лечению порока.

Строго нужно придерживаться рекомендаций врача, соблюдать постельный режим, а позже, с разрешения доктора, передвигаться по палате. Движение улучшает работу сердца, вы дышите глубже и восстанавливаете функцию легких.

В течение 6 месяцев после операции нужно будет принимать аспирин для профилактики тромбообразования и в случае простудных заболеваний проводить антибиотикопрофилактику инфекционного эндокардита.

В течение одного месяца после процедуры необходимо будет ограничить физические нагрузки. Уже через 6 месяцев после операции окклюдер полностью покрывается собственными клеточками сердца – эндотелизируется. До этого времени пациентам стоит воздержаться от плановой вакцинации и планирования беременности. Спустя 6 месяцев наш пациент может вести привычный для него образ жизни – теперь он абсолютно здоров!

* 1. **Основные биохимические параметры сыворотки крови**

**Аспартатаминотрансфераза -** особый фермент, который принимает активное участие   в нормальном взаимодействии практически всех аминокислот и обменных процессах. Норма аспартатаминотрансферазы в сыворотке крови составляет 10−30 МЕ/л. Если же в тканях возникает повреждение, уровень аспартатаминотрансферазы в крови начинает постепенно повышаться, таким образом высвобождается из поврежденных клеток.Повышение активности АСТ может быть следствием некротических явлений в печени и инфаркта миокарда.

**Аланинаминотрансфераза -** является эндогенным ферментом, определение его уровня в крови широко применяется в медицинской практике с целью выявления патологий печени и некоторых других органов. В нормальном состоянии уровень аланинаминотранфсеразы в составе крови довольно низкий. У женщин он составляет 31, у мужчин немного выше – 41. Повышение уровня данного фермента в большинстве случаев является показателем патологий печеночной ткани.

**Щелочная фосфатаза -** это комплекс схожих по структуре ферментов, функция которых состоит в транспорте фосфора в организме. Активность щелочной фосфатазы обеспечивают атомы цинка, входящие в состав каждого из трех ядер молекулы фермента.Фосфатаза щелочная способствует отделению молекул фосфорной кислоты от тех соединений, в составе которых она поступает в организм, точнее, в разные его ткани. Из-за того, что у совершенно здоровых людей показатели уровня щелочной фосфатазы связаны с полом и возрастом референтный диапазон (диапазон нормы) содержания этого фермента в крови достаточно широк.Увеличение концентрации этого фермента наблюдается и при таких онкологических заболеваниях как злокачественные опухоли яичка, лимфогранулематоз, новообразования головного мозга и другие.

**Гамма-глутамилтрансфераза** - фермент, участвующий в обмене аминокислот. Данный фермент в большом количестве находится в почках, желчных ходах, печени.Нормой фермента считается у взрослых мужчин — 8-61 МЕ/л, у взрослых женщин — 5-36 МЕ/л. По другим данным: у мужчин — 10,4-33,8 МЕ/л, у женщин — 8,8-22,0 МЕ/л**. Причиной повышения активности гаммы-глутамилтранспептидазы является поражение печени и желчных ходов.**

**Креатинин -** это один из метаболитов биохимических реакций аминокислотно-белкового обмена в организме. Образование этого соединения происходит постоянно и связано с обменными процессами в мышечной ткани.Норма креатинина в мкмоль/л у мужчин 74-110, женщин 44-80. Состояние, при котором регистрируется повышение содержания креатинина в плазме, называют гиперкреатинемией. Этот метаболит в больше степени относится к следствиям различных состояний и заболеваний, сигнализируя об их наличии. Состояния, при которых регистрируется снижение уровня креатинина в плазме, встречаются крайне редко. Их появление говорит о нарушении метаболических процессов, сопровождающихся глубокими расстройствами белкового обмена в организме вообще, или изолированно в мышечной ткани.

**Альбумин** - это в высокой концентрации содержащаяся в крови белковая фракция, общий процент которой составляет до 65% всей плазмы. В печени происходит его синтез. Она относится к группе низкомолекулярных простых белков. Он отвечает за поддержание в крови осмотического давления.Это позволяет химическим веществам не выпадать в осадок и нормально проходить биохимическим процессам метаболизма. Нормы у взрослых людей меняются несущественно и в возрасте от 14 до 60 лет этот показатель составляет от 35 до 50 единиц.Довольно часто причиной повышения альбумина в крови является банальное обезвоживание организма.

**Общий белок** - это концентрация альбуминов и глобулинов  жидкой составляющей крови в сумме. Измеряется этот показатель в гр/литр. Белок и белковые фракции состоят из сложных аминокислот. Белки крови принимают участие в различных биохимических процессах нашего организма и служат для транспортировки питательных веществ (липидов, гормонов, пигментов, минеральных веществ и т.д.) или же лекарственных составляющих к различным органам и системам. Также они осуществляют роль катализаторов и выполняют иммунную защиту организма. Общий белок служит для поддержания постоянной рН среды циркулирующей крови и принимает активное участие в свертывающей системе. За счет белка все компоненты крови (лейкоциты, эритроциты, тромбоциты) присутствуют в сыворотке во взвешенном состоянии. Именно белок определяет наполнение сосудистого русла.В норме значение общего белка составляет - 65-85 г/л.Повышение или понижение общего белка развивается только при наличии патологии, при которой происходит образование патологических белков.

**Фосфор неорганический** - необходим для нормального функционирования нервной системы и мышечной ткани. Ключевая роль принадлежит фосфору и в обмене веществ, в частности, в белковом и углеводном обмене. Не стоит забывать и об обмене энергией, ведь именно АТФ (аденозинтрифосфат) и креатинфосфат обеспечивают энергетические процессы в клетках и тканях. Без этих веществ мышечные сокращения невыполнимы. В норме значение составляет 0,87-1,45 ммоль/л.

**Холестерин -** это органическое вещество жировой природы, постоянно присутствующее в организме человека и необходимое для нормального метаболизма. Большая часть холестерина производится внутри организма печеночными клетками, часть холестерина поступает извне с продуктами питания.За счет холестерина питаются мышцы скелета, осуществляется транспорт некоторых белков и отработанных веществ, нерастворимых в воде. Предельно допустимый уровень холестерина составляет ниже 5,2 ммоль/л.

**Хлориды -** присутствие элемента в крови позволяет регулировать баланс между уровнем плазмы крови и количеством эритроцитов. Химическое вещество поддерживает соотношение кислот и основ, балансирует уровень воды, отвечает за активацию амилазы. Также хлориды стимулируют выделение желудочного сока, в состав которого входит соляная кислота. В среднем, содержание хлоридов в организме равно 2000 молей. При весе 70 кг норма 30 ммоль на каждый килограмм массы тела.Недостаток вещества – гипохлоридемия – является своеобразной компенсацией в момент развития нарушений кислотно-щелочного баланса в крови. Дефицит хлора наблюдается при осмотическом давлении. Таким образом, организм самостоятельно перераспределяет хлориды в нужной концентрации для нормализации состояния. Гиперхлоридемия – повышение уровня хлора, развивающееся при резком обильном поступлении хлористых соединений в организм выше 15 грамм в течение 24 часов. Это довольно опасный симптом, так как хлор – токсичное вещество, которое в больших количествах способствуют уничтожению живых клеток и тормозит развитие процессов в организме.

**Билирубин** – один из продуктов пигментного обмена организма, образуется из разрушенных и отживших свой век эритроцитов, путем переработки гемоглобина.Уровень билирубина в крови – это один из наглядных показателей работы печени и частично, селезенки, обмена веществ в целом.Уровень общего билирубина – от 5,1 до 17 ммоль\л. Существенное увеличение содержания билирубина в человеческой крови обусловлено такими причинами, как повышение интенсивности гемолиза эритроцитов, серьезное поражение паренхимы печени. Низкий билирубин в крови диагностируется при хронической почечной недостаточности, остром лейкозе, туберкулезной интоксикации, алиментарном истощении, апластической анемии.

**Триглицериды -** являются самым главным источником энергии для клеток, они являются производными глицерина. Поступление триглицеридов в организм человека происходит вместе с пищей, далее они синтезируются в жировой ткани, потом печени и в кишечнике. В случае если у человека триглицериды выше нормы, то это может говорить о таких возможных заболеваниях как: [гипертоническая болезнь](http://www.ayzdorov.ru/Bolezn_gipertoniya.php), инфаркт миокарда, ишемическая болезнь сердца, атеросклероз, хроническая почечная недостаточность, тромбоз сосудов мозга, вирусный [гепатит](http://www.ayzdorov.ru/Bolezn_gepatit.php), [цирроз печени](http://www.ayzdorov.ru/Bolezn_cirroz.php), [ожирение](http://www.ayzdorov.ru/Bolezn_ozhirenie.php), [подагра](http://www.ayzdorov.ru/Bolezn_podagra.php), талассемия, синдром Дауна, нарушение толерантности к глюкозе, гиперкальцемия, невротическая [анорексия](http://www.ayzdorov.ru/Bolezn_anoreksiya.php), [сахарный диабет](http://www.ayzdorov.ru/Bolezn_diabet.php), гипотиреоз, острый и хронический [панкреатит](http://www.ayzdorov.ru/Bolezn_pankreatit.php), а также [алкоголизм](http://www.ayzdorov.ru/Bolezn_alkogolizm.php).

Выше нормы триглицериды также могут быть повышены и из-за приёма пероральных противозачаточных средств, различных препаратов половых гормонов, а также при беременности.

**Глюкоза** – играет важнейшую роль в обеспечении энергией тканей организма и в клеточном дыхании.Сахар крови норма 3,3–5,5 ммоль/л – норма независимо от возраста*.*Повышенная глюкоза в крови отмечается при наличии заболеваний эндокринной системы, поджелудочной железы, почек и печени, при инфаркте и инсульте, сахарном диабете. Почти те же причины, только с противоположным знаком, приводят к понижению глюкозы в крови. Сахар понижен при патологиях поджелудочной железы, некоторых эндокринных заболеваниях, передозировке инсулина, тяжелых болезнях печени, злокачественных опухолях, ферментопатии, вегетативных расстройствах, алкогольных и химических отравлениях, приеме стероидов и амфетаминов, лихорадке и сильной физической нагрузке.

**Мочевина**– это то, что в конечном итоге остается от белков после их распада.Мочевина образуется в организме при распаде протеинов, является конечным продуктом белкового обмена и выводится вместе с мочой. Относится она к азотосодержащим веществам, которые остаются после удаления из крови белков. Это один из основных компонентов остаточного азота, на который приходится около 90 %. По уровню ее содержания судят о работе почек. Если повышена мочевина в крови, это может быть признаком заболевания. Нормамочевины в крови взрослого здорового человека находится в пределах **2,5 – 8,3 ммоль/литр.**Сильно повышенная концентрация мочевины в крови, возникающая как следствие острой и хронической почечной недостаточности хорошо известна специалистам разных профилей и называется уремическим синдромом.

**Калий** – это минеральный элемент, необходимый для нормальной жизнедеятельности клеток живого организма – он является их важной частью. Даже небольшие изменения количества этого элемента в организме могут повлиять на его работу. Калий выводится через почки; если его выводится слишком много, развивается гипокалиемия – нехватка калия, а потом дефицит.Состояние организма, при котором калий в крови превышает 5,3 ммоль/л называетсягиперкалиемией.  В большинстве случаев патологическое состояние развивается у больных с недостаточной функцией мочевыделительной системы.

**Натрий** - в организме человека натрий содержится во всех жидкостях, органах и тканях: вместе с калием он относится к самым востребованным элементам. Без него невозможен нормальный баланс жидкости в организме; в форме различных солей он входит в состав крови, лимфы и пищеварительных соков.В среднем норма натрия в крови взрослого человека равна 123-140 ммоль/л.

**Кальций** – это элемент, без которого не могут протекать нормально основные жизненные процессы. Почти все растения и животные нуждаются в кальции, для того, чтобы жить: он есть во всех органах и тканях живых организмов. Жить без кальция могут очень немногие существа; растениям, как и животным, он нужен в строгих соотношениях. Соединения кальция очень широко применяются в медицине, для лечения и профилактики многих заболеваний.Есть живые организмы, состоящие из кальция на 38% - это очень много. У человека в организме содержится до 2% кальция, но это больше, чем доля какого-либо другого элемента, и он нам действительно необходим.

**Глава 2. Материалы и методы исследования**

* 1. **Материалы исследования**

При проведении эксперимента были использованы 18 самцов беспородных белых крыс массой 250-300 г в возрасте 3 месяцев. Животных содержали в стандартных условиях вивария при постоянном доступе к воде и пище, 12-часовой смене светового режима:

* Интактная группа - 6 крыс, которых не подвергали операционному вмешательству;
* Контрольная группа – 6 крыс, которым произведена операция, но без имплантации материала;
* Опытная группа–6 крыс, которым произведена операция с имплантацией внеклеточного коллагенового матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи.

Поскольку клетки являются основными факторами иммуногенности, в качестве мембраны окклюдера предлагается использовать бесклеточный коллагеновый матрикс.

**2.2. Моделирование эксперимента подкожной имплантации материала**

Все операции проводились под хлороформным наркозом. Конечности животных были зафиксированы. Вдоль линии спины делались надрезы и формировались карманы с обеих сторон от надреза. Материал перед имплантацией стерилизовали окисью этилена. Затем зашиваются кетгутовыми нитями и надрезы заклеиваются БФ6

Наблюдали за животными в течение 2 и 4 недель.

После 2 и 4 недель животные выводились из эксперимента путем декапитации.

Собранную кровь центрифугировали на аппарате ОПН-8 с угловымротером, в течение 15 минут 1000 об/мин.

Разделение веществ с помощью центрифугирования основано на разном поведении частиц в центробежном поле. Суспензию частиц, помещенную в пробирку, загружают в ротор, установленный на валу привода центрифуги.Скорость седиментации сферических частиц зависит не только от центробежного ускорения, но и от плотности и радиуса самих частиц и от вязкости среды суспендирования.

При разделении веществ необходимо учитывать и такие важные факторы, как плотность и вязкость среды.Основные компоненты клетки осаждаются в следующей последовательности: сначала целые клетки и их фрагменты, затем ядра, хлоропласты, митохондрии, лизосомы, микросомы и, наконец, рибосомы.

Препаративное центрифугирование заключается в выделении биологического материала для последующих биохимических исследований. При этом можно брать большие количества исходного биологического материала, например посевы микробных клеток из периодических или непрерывных культур, а также посевы растительных и животных клеток из культур ткани и плазмы крови.

С помощью препаративного центрифугирования выделяют большое количество клеточных частиц для изучения их морфологии, структуры и биологической активности. Метод применяется также для выделения таких биологических макромолекул, как ДНК и белки из предварительно очищенных препаратов.

Полученную сыворотку замораживали и хранили при температуре – 20С.

В сыворотке определялись следующие параметры: аспартатаминотрансфераза (АСТ), щелочнаяфосфатаза, аланинаминотрансфераза(АЛТ), Ɣ-глутамилтрансфераза (гамма-ГТ), а также альбумин, креатинин, общий белок, фосфор неорганический, холестерин, хлориды, калий, кальций, натрий, билирубин, мочевину, глюкозу, триглецериды.

**2.3. Метод определения аспартатаминотрансферазы (АСТ)**

Фермент АСТ катализирует реакцию переаминированиямежду L-аспартатом и α-кетоглутаровой кислотой собразованием оксалоацетата. Об активности ферментасудят по приросту оксалоацетата, образующего с 2,4-ДНФГ(2,4-динитрофенилгидразин) окрашенные гидразоны.Активность АСТ пропорциональна количеству образовавшихся гидразонов, котороеопределяется фотометрическипри длине волны 537 (500-560) нм.

L-аспартат + α-кетоглутарат= оксалоацетат + L-глутамат

**Норма**: активности АСТ в сыворотке крови: 0,03 - 0,19 мкмоль/с × л или 0,1 - 0,68 ммоль/ч × л.

**Состав набора:** реагент 1 (буфер-субстратная смесь); реагент 2 (раствор 2,4-ДНФГ); реагент 3 (натрия гидроокись), калибратор (калибровочный раствор пирувата натрия сконцентрацией 1,0 ммоль/л).

**Подготовка к анализу:** Реагенты 1, 2 и калибратор готовы к применению.Содержимое флакона с Реагентом 3 (или аликвоту)развести дистиллированной водой, свободной откарбонатов, в соотношении 1:9. Полученныйрабочийраствор Реагента 3 хранить при комнатной температуре(+18-25 °С) в плотно закрытом полиэтиленовом флаконе неболее 3 месяцев.

Таблица 1. Схема добавления реактивов для определения активности АСТ.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Компоненты реакционной среды** | **Опытная проба** | **Контрольная проба** |
| **Реагент 1, мл** | 0.25 | 0.25 |
| Содержимое пробирок прогреть при +37 °С в течение 5 минут | | |
| **Сыворотка крови, мл** | 0.05 | - |
| Пробы тщательно перемешать и инкубировать в течение 60 минут при +37 °С | | |
| **Реагент 2, мл** | 0.25 | 0.25 |
| **Сыворотка, мл** | - | 0.05 |
| Пробы тщательно перемешать и инкубировать 20 минут при комнатной температуре (18-25°С) | | |
| **Рабочий р-р Реагента 3, м** | 2.5 | 2.5 |
| Пробы тщательно перемешать и инкубировать 10 минут при комнатной температуре (18-25°С) | | |

Измерить оптическую плотность опытной пробы против соответствующей контрольной пробы при длине волны 537нм (500-560 нм) в кювете с длиной оптического пути 1,0 см. Окраска растворов стабильна не более 2 часов.

Таблица 2 .Приготовление разведений реактивов для калибровочного графика АСТ.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| № пробы | Калибратор, мкл | Вода дистиллированная,мкл | раствор 2,4-ДНФГ,мкл | Ферментативная активность | |
| мкмоль/сxл | ммоль/ч xл |
| 1 | 5 | 595 | 500 | 0.014 | 0.05 |
| 2 | 20 | 580 | 500 | 0.056 | 0.20 |
| 3 | 50 | 550 | 500 | 0.139 | 0.50 |
| 4 | 100 | 500 | 500 | 0.278 | 1.00 |
| 5 | 200 | 400 | 500 | 0.556 | 4.00 |
| 6 | 300 | 300 | 500 | 0.834 | 3.00 |
| контроль | - | 600 | 500 | - | - |
| Пробы перемешать и инкубировать 20 минут при +18-25 °С | | | | | |
| Внести во все пробирки по 5,0 мл рабочего раствора натрия гидроокись | | | | | |
| Пробы перемешать и инкубировать 10 минут при +18-25 °С | | | | | |

Измерить оптические плотности калибровочных растворов (проб) против контрольной пробы (контр.) при длине волны 537 нм (500-560 нм) в кювете с длиной оптическогопути 1,0 см. Построить график зависимости оптическойплотности от активности фермента.По калибровочному графику рассчитать коэффициентпересчёта активности фермента (К) по формуле:

***К = А / Е,***

где: *А* – активность фермента, взятая из таблицы,*Е* – экстинкция соответствующей калибровочной пробы.

Активность АСТ (А) найти по калибровочному графику,сопоставляя на оси ординат значения оптической плотностидля каждой пробы, а на оси абсцисс соответствующие имзначения активности АСТ, или рассчитать по формуле:

***А = К × Е,***

где: *А* – активность фермента; *Е* – экстинкция опытной пробы; *К*– коэффициент расчёта активности фермента.

Если активность АСТ в анализируемом образце сыворотки крови превышает 1,67 мкмоль/(с×л), его следует развести физиологическим раствором в 2 раза, повторить анализ и полученный результат умножить на 2.

****

**2.4. Метод определения щелочной фосфатазы**

Щелочная фосфатаза (ЩФ) в щелочной средекатализирует реакцию дефосфорилированиясубстратаp-нитрофенил-фосфата с образованием p-нитрофенолаи фосфата. Скорость образования окрашенногопродукта p-нитрофенола определяется по увеличениюоптической плотности реакционной среды при 405 нмипропорциональна активности щелочной фосфатазы.

р-Нитрофенилфосфат + Н2О = р-Нитрофенол + фосфат

**Норма:**активности щелочной фосфатазы всыворотке или плазме крови: мужчины – от 90 до 320 Ед/л;женщины – от 70 до 260 Ед/л.

**Набор состава**: реагент №1- Глициновый буфер, реагент №2 - Раствор едкого натра, реагент №3 - *р*-Нитрофенилфосфат.Калибровочный раствор *р*-нитрофенола - 50 мкмоль/л.

**Подготовка к анализу**: Смешайте реагент №1 и реагент №3 в соотношении 4:1.Реагент стабилен в защищенном от света месте не менее10 дней при температуре 2-8°С или 3 месяца при -20°С.Реагент №2 разведите дистиллированной водой в 10раз; раствор стабилен в плотно закрытом полиэтиленовом флаконе.

Таблица 3. Схема добавления реактивов для определения активности ЩФ.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Компоненты реакционной среды** | **Опытная проба** | **Контрольная проба** |
| **Рабочий реагент, мл** | 0.2 | 0.2 |
| **Исследуемый материал, мкл** | 20 | - |
| Инкубируйте пробы в течение 30 минут при 37°С | | |
| **Разведенный реагент № 2, мл** | 2.0 | 2.0 |
| **Исследуемый материал, мкл** | - | 20 |

Пробы перемешайте и фотометрируйте опытные пробыпротив соответствующих контрольных проб при длиневолны 405 нм.

Таблица 4. Приготовление разведений реактива для калибровочного графика ЩФ.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **№ пробы** | **Калибровочный раствор, мл** | **Разведенный реагент № 2 , мл** | **Активность фермента нмоль/(схл)** |
| 1 | 0.5 | 5.05 | 278 |
| 2 | 1.0 | 4.55 | 556 |
| 3 | 1.5 | 4.05 | 834 |
| 4 | 2.5 | 3.05 | 1390 |
| 5 | 3.5 | 2.05 | 1946 |

Фотометрируйте калибровочные пробы против разведенного реагента №2 при длине волны 405 нм.

По калибровочному графику рассчитайте коэффициент:

***К = А/Е,***

где: А – активность фермента, взятая из таблицы,

Е – оптическая плотность соответствующейкалибровочнойпробы.



Активность фермента в исследуемой пробе (А пробы)рассчитайте по формуле:

***А пробы = К×Е пробы****,*

где: К – коэффициент, рассчитанный по калибровочномуграфику,

Е пробы – оптическая плотность опытной пробы,измеренная против соответствующей контрольнойпробы.

**2.5. Метод определения аланинаминотрансферазы (АЛТ)**

Фермент АЛТ катализирует реакцию переаминированиямежду L-аланином и α-кетоглутаровой кислотой собразованием пировиноградной кислоты. Об активностифермента судят по приросту пировиноградной кислоты,образующей с 2,4-ДНФГ (динитрофенилгидразин) окрашенные гидразоны.Активность АЛТ пропорциональна количеству образовавшихся гидразоновпирувата, которое определяетсяфотометрически при длине волны 537 (500-560) нм.

L - аланин + α - кетоглутарат=пируват + L-глутамат

**Норма**:активности АЛТ в сыворотке крови0,03 - 0,19 мкмоль/с × л или 0,1 - 0,68 ммоль/ч × л..

**Состав набора:** реагент 1 (буфер-субстратная смесь), реагент 2 (раствор 2,4-ДНФГ), реагент 3 (натрия гидроокись), калибратор (раствор пирувата натрия) - 1,0 ммоль/л.

**Подготовка к анализу**: Реагенты 1, 2 и калибратор готовы к применению.Содержимое флакона с Реагентом 3 (или аликвоту) развести дистиллированной водой, свободной от карбонатов,в соотношении 1:9. Полученный рабочий раствор Реагента 3хранить при комнатной температуре (+18-25 °С) в плотнозакрытом полиэтиленовом флаконе не более 3 месяцев.

Таблица 5. Схема добавления реактивов для определения активности АЛТ.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Компоненты реакционной среды** | **Опытная проба** | **Контрольная проба** |
| **Реагент 1, мл** | 0.25 | 0.25 |
| Содержимое пробирок прогреть при 37°С в течение 5 минут | | |
| **Сыворотка крови, мл** | 0.05 | - |
| Пробы тщательно перемешать и инкубировать в течение 30 минут при 37°С | | |
| **Реагент 2, мл** | 0.25 | 0.25 |
| **Сыворотка, мл** | - | 0.05 |
| Пробы тщательно перемешать и инкубировать 20 минут при комнатной температуре | | |
| **Рабочий раствор Реагента 3, мл** | 2.5 | 2.5 |
| Пробы тщательно перемешать и инкубировать 10 минут при комнатной температуре | | |

Измерить оптическую плотность опытной пробы противсоответствующей контрольной пробы при длине волны 537нм (500-560 нм) в кювете с длиной оптического пути 1,0 см.Окраска растворов стабильна не более 2 часов.

Таблица 6. Приготовление разведений реактива для калибровочного графика АЛТ.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **№ пробы** | **Калибратор, мкл** | **Вода дистиллированная, мкл** | **Раствор 2,4-ДНФГ, мкл** | **Ферментативная активность** | |
| **мкмоль/сxл** | **ммоль/ч xл** |
| 1 | 5 | 595 | 500 | 0.028 | 0.10 |
| 2 | 20 | 580 | 500 | 0.112 | 0.40 |
| 3 | 50 | 550 | 500 | 0.278 | 1.0 |
| 4 | 100 | 500 | 500 | 0.556 | 2.0 |
| 5 | 200 | 400 | 500 | 1.112 | 4.0 |
| 6 | 300 | 300 | 500 | 1.668 | 6.0 |
| контроль | - | 600 | 500 | - | - |
| Пробы перемешать и инкубировать 20 минут при 18-25°С | | | | | |
| Внести во все пробирки по 5.0 мл рабочего раствора натрия гидроокись | | | | | |
| Пробы перемешать и инкубировать 10 минут при 18-25°С | | | | | |

Измерить оптические плотности калибровочных растворовпротив контрольной пробы при длине волны 537 нм(500-560 нм) в кювете с длиной оптического пути 1,0 см.Построить график зависимости оптической плотности отактивности фермента.

По калибровочному графику рассчитать коэффициентпересчёта активности фермента (К) по формуле:

***К = А / Е,***

где: *А* – активность фермента, взятая из таблицы,

*Е* – экстинкция соответствующей калибровочной пробы.

Активность АЛТ (А) найти по калибровочному графику,сопоставляя на оси ординат значения оптической плотностидля каждой пробы, а на оси абсцисс соответствующие имзначения активности АЛТ, или рассчитать по формуле:

***А = К × Е,***

где: *А* – активность фермента; *Е* – экстинкция опытной пробы; *К*– коэффициент расчёта активности фермента.

**

Если активность АЛТ в анализируемом образце сывороткикрови превышает 1,67 мкмоль/(с×л), его следует развестифизиологическим раствором в 2 раза, повторить анализ иполученный результат умножить на 2.

**2.6. Метод определения Ɣ-глутамилтрансферазы (гамма-ГТ)**

Метод основан на способности гамма-ГТ переноситьƔ-глутамиловую группу синтетического субстрата L-Ɣ-глутамил-3-карбокси-4-нитроанилида на акцептор глицил-глицин, что сопровождается высвобождением в инкубационную среду 5-амино-2-нитробензоата. Активностьфермента прямо пропорциональна количеству образовавшегося 5-амино-2-нитробензоата в пробе и измеряетсяфотометрически при длине волны 405 (380 – 430) нм.

L-Ɣ-глутамил-3-карбокси-4-нитроанилид + глицилглицин= L-Ɣ-глутамилглицилглицин+5-амино-2-нитробензоат

**Норма**: активности гамма-ГТ в сывороткекрови составляют от 250 до 1767 нмоль/(с х л) для мужчин,от 167 до 1100 нмоль/(с х л) для женщин.

**Состав набора**: реагент 1 (буферный раствор),реагент 2 (раствор уксусной кислоты), реагент 3 (L-Ɣ-глутамил-3-карбокси-4-нитроанилид), калибратор – раствор ρ-нитроанилина (518 мг/л).

**Подготовка к анализу**: Перед проведением анализа смешать необходимоеколичество реагента 1 и реагента 3 в соотношении 4:1.Полученный рабочий раствор можно хранить при+2–8 °С в защищенном от света месте в плотно закрытомполиэтиленовом флаконе не более 20 дней.

Таблица 7. Схема добавления реактивов для определения активности ГГТ.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Компоненты реакционной среды** | **Опытная проба** | **Контрольная проба** |
| **Рабочий реагент, мл** | 0.5 | 0.5 |
| **Исследуемый образец, мл** | 0.05 | - |
| Перемешать и инкубировать при +37 °С точно 15 минут | | |
| **Реагент 2, мл** | 1.0 | 1.0- |
| **Вода дистиллированная, мл** | 2.0 | 2.0 |
| **Исследуемый образец, мл** | - | 0.05 |

Пробы тщательно перемешать и измерить оптическуюплотность опытной пробы против соответствующейконтрольной пробы при длине волны 405 (380 – 430) нм.

Таблица 8. Приготовление разведений реактива для калибровочного графика ГГТ.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **№ пробы** | **Калибратор, мл** | **Вода дистиллированная, мл** | **Ферментативная активность, Нмоль\сек\*л** |
| 1 | 0.1 | 2.45 | 163 |
| 2 | 0.2 | 0.50 | 1042 |
| 3 | 0.2 | 0.20 | 2083 |
| 4 | 0.2 | 0.06 | 3205 |
| 5 | 0.2 | - | 4166 |

Пробы тщательно перемешать, затем в каждую из пятизаранее подготовленных пробирок внести по 0,05 млкаждого из полученных растворов, добавить по 1,0мл реагента 2 и по 2,5 мл дистиллированной воды.Перемешать и измерить оптическую плотность полученныхпроб против разведенного дистиллированной водой всоотношении 1:2,55 реагента 2 при длине волны 405 (380 –430) нм в кювете с длиной оптического пути 1,0 см.

Построить калибровочный график, откладывая на осиординат значения оптической плотности для каждойпробы, а на оси абсцисс – соответствующие им значенияактивности гамма-глутамилтрансферазы.



Активность гамма-глутамилтрансферазы рассчитать покалибровочному графику.

**2.7. Метод определения альбумина**

Определение концентрации альбумина основано на образовании окрашенного комплекса альбумина с бромкрезоловым зелёным в слабокислой среде в присутствии детергента. Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна концентрации альбумина в пробе и измеряется фотометрически при длине волны 628 (620640) нм.

**Состав набора:**Монореагент, калибратор – раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) 60 г/л.

**Норма**:содержания альбумина в сыворотке крови крыс 3,8-4,8 г/л.

**Проведение анализа:**

Таблица 9 . Схема добавления реактивов для определения активности альбумина.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Компоненты реакционной среды** | **Опытная проба** | **Калибровочная проба** | **Контрольная (холостая) проба** |
| **Монореагент, мл** | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| **Сыворотка, мл** | 0,01 | - | - |
| **Калибратор, мл** | - | 0,01 | - |
| **Вода дистилл., мл** | - | - | 0,01 |

Пробы тщательно перемешать и инкубировать в течение 5 минут при +18-25 °С.Измерить оптическую плотность опытной и калибровочной проб против контрольной (холостой) пробы при длине волны 628 (620-640) нм в кювете с длиной оптического пути 1,0 см. Окраска растворов стабильна в течение 3 часов после окончания инкубации при хранении проб в защищённом от света месте при +18-25 °С.

Концентрацию альбумина в сыворотке или плазме (С, г/л) рассчитать по формуле:

**С = (Е пробы/Е калибр.) х 60 г/л**

где: Е пробы – оптическая плотность опытной пробы, ед. опт.плотн.; Е калибр. – оптическая плотность калибровочной пробы; 60 – концентрация альбумина в калибраторе, г/л.

Если концентрация альбумина в анализируемом образце сыворотки или плазмы крови превышает 80 г/л, его следует развести 0,9% раствором хлористого натрия в 2 раза, повторить анализ и полученный результат умножить на 2.

**2.8. Метод определения креатинина**

Креатинин в щелочной среде образует с пикриновой кислотой окрашенный комплекс. Интенсивность окраски образовавшегося комплекса прямо пропорциональна концентрации креатинина в анализируемой пробе и измеряется фотометрически при длине волны 505 (490-520) нм.

**Состав набора:**Реагент 1 (пикриновая кислота), реагент 2 (гидроокись натрия), реагент 3 (трихлоруксусная кислота), калибратор – раствор креатинина 177 мкмоль/л, согласно процедуре анализа.

**Норма:**в сыворотке крови крыс 0,3-0,8мкмоль/л

**Подготовка к анализу:** К 0,5 мл сыворотки крови добавить 1,0 мл дистиллированной воды и 0,5 мл Реагента 3. Содержимое пробирок тщательно перемешать и выдержать в течение 10 минут при комнатной температуре +18-25 °С, после чего пробы центрифугировать с ускорением 900 g в течение 15 минут. Для дальнейшего анализа использовать только прозрачную надосадочную жидкость (супернатант).

Таблица 10. Схема добавления реактивов для определения активностикреатинина.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Компоненты реакционной среды** | **Опытная проба** | **Калибровочная проба** | **Контрольная (холостая) проба** |
| **Супернатант пробы, мл** | 1,0 | - | - |
| **Калибратор, мл** | - | 1,0 | - |
| **Контрольный раствор, мл** | - | - | 1,0 |
| **Реагент 2, мл** | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| **Реагент 1, мл** | 0,5 | 0,5 | 0,5 |

Пробы тщательно перемешать и инкубировать при +18-25 °С в течение 20 минут (точно!), после чего измерить оптическую плотность опытной и калибровочной проб против контрольной (холостой) пробы при длине волны 505 (490-520) нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм. Окраска раствора стабильна не менее 1 часа.

Расчет концентрации(C) креатинина:

**С = (Е пробы/Е калибр.) х 177 мкмоль/л**

где: Е пробы – оптическая плотность исследуемой пробы; Е калибр. - оптическая плотность калибровочной пробы; 177 мкмоль/л – концентрация креатинина в калибраторе.

Если концентрация креатинина в анализируемом образце сыворотки крови превышает 440 мкмоль/л, то образец следует развести дистиллированной водой в 2 раза, повторить анализ и полученный результат умножить на 2.

**2.9. Метод определения общего белка**

Белок образует окрашенный комплекс с ионами меди в щелочной среде, интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна концентрации общего белка в пробе и измеряется фотометрически при длине волны 540 нм.

**Состав набора:**Биуретовый реагент, калибратор (калибровочный раствор БСА с концентрацией 70 г/л)

**Норма:**содержания общего белка в сыворотке или плазме крови 65-85 г/л

**Подготовка к анализу:**Перед проведением анализа развести в колбе конической вместимостью 100 мл необходимое количество биуретового реагента дистиллированной водой в 5 раз (1 часть реактива и 4 части воды). Рабочий реагент стабилен при комнатной температуре (+18-25 °с) не более 2 месяцев в защищённом от света месте.

Таблица 11. Схема добавления реактивов для определения активности общего белка.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Компоненты реакционной среды** | **Опытная проба** | **Калибровочная проба** | **Контрольная (холостая) проба** |
| **Рабочий реагент, мл** | 5,0 | 5,0 | 5,0 |
| **Сыворотка крови, мл** | 0,1 | - | - |
| **Калибратор, мл** | - | 0,1 | - |
| **Вода дистилл., мл** | - | - | 0,1 |

Пробы тщательно перемешать и инкубировать при комнатной температуре (+18-25 °с) в течение 30 мин. измерить оптические плотности опытной и калибровочной проб против контрольной (холостой) пробы при длине волны 540 нм.интенсивность окраски стабильна в течение часа после окончания инкубации при хранении проб в защищённом от света месте при комнатной температуре (+18-25 °С).

Концентрацию общего белка в сыворотке или плазме (C, г/л) рассчитать по формуле:

**С = (Е пробы/Е калибр.) х 70**

где: Е пробы – оптическая плотность опытной пробы, ед. опт.плотн.;Е калибр. – оптическая плотность калибровочной пробы, ед. опт. плотн.; 70 – концентрация общего белка в калибраторе, г/л.

**2.10. Метод определения фосфора неорганического**

Метод основан на способности фосфат-ионов образовывать в кислой среде в присутствии детергента с молибдатом аммония фосфорномолибденовый комплекс, оптическая плотность которого при длине волны 340 нмпропорциональна концентрации неорганического фосфора в исследуемом образце.

**Состав набора:**реагент 1 (молибденовый реагент), реагент 2 (детергент), калибратор (калибровочный раствор ортофосфорной кислоты с концентрацией 1,615 ммоль/л, в пересчете на фосфор).

**Норма:**содержания неорганического фосфора в сыворотке крови 5,8 – 8,2ммоль/л.

**Подготовка к анализу:**приготовление рабочего реагента: перед проведением анализа смешать необходимое количество реагента 1 и реагента 2 в соотношении 100:1.

Таблица 12. Схема добавления реактивов для определения активности фосфора неорганического.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Компоненты реакционной среды** | **Опытная проба** | **Калибровочная проба** | **Контрольная (холостая) проба** |
| **Рабочий реагент, мл** | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| **Сыворотка крови, мл** | 0,02 | - | - |
| **Калибратор, мл** | - | 0,02 | - |
| **Вода дистилл., мл** | - | - | 0,02 |

Пробы тщательно перемешать и выдержать в течение 5 минут при комнатной температуре (+18-25 °С) измерить оптическую плотность опытной и калибровочной проб против контрольной (холостой) пробы при длине волны 340 нм в кювете с длиной оптического пути 1,0 см.

Величина оптической плотности растворов стабильна в течение 60 минут, при хранении проб в защищённом от света месте при комнатной температуре (+18-25 °С).

Концентрацию неорганического фосфора в сыворотке крови (С, ммоль/л) рассчитать по формуле:

**С = (Е пробы/Е калибр.) х 1,615**

где: Е пробы – оптическая плотность опытной пробы, ед. опт.плотн.; Е калибр. – оптическая плотность калибровочной пробы, ед. опт. плотн.; 1,615 – концентрация неорганического фосфора в калибраторе, ммоль/л.

**2.11. Метод определения холестерина общего**

Холестерин из состава эфиров высвобождается под действием фермента холестерол-эстеразы (ХЭ). При участии фермента холестеролоксидазы (ХО) холестерин окисляется до 4-холестен-3-она. Образующаяся перекись водорода при участии фермента пероксидазы (ПО) способствует окислительномуазосочетанию 4-аминоантипирина (4-ААП) и фенола с образованием окрашенного соединения (хинониминовый краситель). Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна содержанию холестерина в исследуемом материале и определяется фотометрически при длине волны 500 (490-520) нм

Эфиры холестерина + Н2О = холестерин + жирные кислоты

Холестерин + О2= 4-холестен-3-он + Н2О2

2Н2О2 + 4-ААП + фенол = хинониминовый краситель + 4Н2О

**Состав набора:**монореагент; калибратор – раствор холестерина, 5,17 ммоль/л.

**Норма:** содержания общего холестерина4.40-5.17 ммоль/л

**Подготовка к анализу:**

Таблица 13. Схема добавления реактивов для определения активности холестерина общего.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Компоненты реакционной среды** | **Опытная проба** | **Калибровочная проба** | **Контрольная (холостая) проба** |
| **Рабочий реагент, мл** | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| **Сыворотка крови, мл** | 0,02 | - | - |
| **Калибратор, мл** | - | 0,02 | - |
| **Вода дистилл., мл** | - | - | 0,02 |

Содержимое пробирок тщательно перемешать и инкубировать не менее 10 минут в термостате при +37 °С. Измерить оптическую плотность опытной и калибровочной проб против контрольной (холостой) пробы при длине волны 500 (490-520) нм в кювете с длиной оптического пути 1,0 см.

Концентрацию холестерина в сыворотке или плазме крови (С, ммоль/л) рассчитать по формуле:

**С = (Е пробы/Е калибр.) х 5,17 ммоль/л**

где: Е пробы – оптическая плотность опытной пробы, ед. опт.плотн.;Е калибр. – оптическая плотность калибратора, ед. опт. плотн.;5,17 – концентрация холестерина в калибраторе, ммоль/л.

Если при определении концентрации холестерина результат превышает 25,8 ммоль/л, анализируемую пробу следует развести дистиллированной водой в два раза, повторить анализ и полученный результат умножить на 2.

**2.12. Метод определения хлоридов**

Метод определения основан на способности тиоцианата ртути образовывать с ионами железа окрашенные комплексы в присутствии ионов хлора. Интенсивность окраски реакционной среды прямо пропорциональна концентрации хлоридов в анализируемой пробе и измеряется фотометрически при длине волны 540 (505-550) нм.

**Состав набора:**реагент 1; реагент 2; калибратор: раствор хлорида натрия (100 ммоль/л).

**Норма:**содержания хлоридов в сыворотке крови97-108 ммоль/л

**Подготовка к анализу:**Перед проведением анализа смешать необходимое количество Реагента 1 и Реагента 2 в соотношении 9:1. В Реагенте 2 допустимо выпадение осадка. В этом случае Реагент 2 необходимо нагреть до +37 °С и осторожным перемешиванием растворить осадок.

Таблица 14. Схема добавления реактивов для определения активности хлоридов.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Компоненты реакционной среды** | **Опытная проба** | **Калибровочная проба** | **Контрольная (холостая) проба** |
| **Рабочий реагент, мл** | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| **Сыворотка крови, мл** | 0,01 | - | - |
| **Калибратор, мл** | - | 0,01 | - |
| **Вода дистилл., мл** | - | - | 0,01 |

В пробирки вместимостью 5,0-10 мл внести по 0,01 мл сыворотки или плазмы крови. В отдельные пробирки внести по 0,01 мл калибратора (калибровочная проба) и бидистиллированной воды (холостая проба). Во все пробирки добавить по 2,0 мл рабочего реагента. Пробы тщательно перемешать и инкубировать в течение 5 минут при комнатной температуре (+18-25 °С). Измерить оптическую плотность опытной и калибровочной проб против контрольной (холостой) пробы при длине волны 540 (505-550) нм в кювете с длиной оптического пути 1,0 см. Окраска растворов стабильна не менее 30 минут.

Концентрацию хлоридов в сыворотке или плазме крови (С, ммоль/л) рассчитать по формуле:

**С = (Е пробы/Е калибр.) х 100**

где: Е пробы – оптическая плотность опытной пробы; Е калибр. – оптическая плотность калибровочной пробы; 100 – концентрация хлоридов в Калибраторе, ммоль/л.

Если концентрация хлоридов в анализируемом образце сыворотки или плазмы крови превышает 160 ммоль/л, его следует развести бидистиллированной водой в 2 раза, повторить анализ и полученный результат умножить на 2.

**2.13. Метод определения калия**

В результате реакции между ионами калия и тетрафенилборатом образуется стабильная суспензия. Интенсивность мутности суспензии пропорциональна концентрации ионов калия в анализируемой пробе и измеряется фотометрически при длине волны 578 (570-590) нм.

**Состав набора:** реагент 1; реагент 2; калибратор – раствор калия хлорида 5,0 ммоль/л

**Норма:** концентрации калия в сыворотке крови 3,6-5,5 ммоль/л;

**Проведение анализа:**

Таблица 15. Схема добавления реактивов для определения активности калия.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Компоненты реакционной среды** | **Опытная проба** | **Калибровочная проба** | **Контрольная (холостая) проба** |
| **Реагент 1, мл** | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| **Сыворотка крови, мл** | 0,05 | - | - |
| **Калибратор, мл** | - | 0,05 | - |
| **Вода дистилл., мл** | - | - | 0,05 |
| Пробы тщательно перемешать и инкубировать 5 минут при комнатной температуре (+18-25 °С) | | | |
| **Реагент 2, мл** | 1,9 | 1,9 | 1,9 |

Анализируемую пробу, Калибратор и бидистиллированную воду медленно внести в Реагент 1. Пробы перемешать и инкубировать в течение 5 минут при комнатной температуре (+18-25 °С). Затем во все пробы добавить по 1,9 мл Реагента 2, тщательно перемешать и измерить оптическую плотность опытных и калибровочной проб против контрольной (холостой) пробы при длине волны 578 (570-590) нм в кювете с длиной оптического пути 1,0 см.

Концентрацию калия в исследуемом образце (С, ммоль/л) рассчитать по формуле:

**С = (Е пробы/Е калибр.) х 5**

где: Е пробы – оптическая плотность опытной пробы; Е калибр. – оптическая плотность калибровочной пробы; 5 – концентрация калия в калибраторе, ммоль/л.

**2.14. Метод определения кальция**

Ионы кальция в щелочной среде образуют с о-крезолфталеинкомплексоном окрашенный комплекс. Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна концентрации кальция в пробе и измеряется фотометрически при длине волны 570 (540-590) нм

**Состав набора:**реагент 1 (буферный раствор); реагент 2 (хромоген); калибратор – 2,5 ммоль/л (10 мг/дл).

**Норма:** содержания кальция в сыворотке или плазме крови 2,15 - 2,50 ммоль/л.

**Подготовка к анализу:**

Таблица 16. Схема добавления реактивов для определения активности кальция.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Компоненты реакционной среды** | **Опытная проба** | **Калибровочная проба** | **Контрольная (холостая) проба** |
| **Реагент 1, мл** | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| **Реагент 2, мл** | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| **Сыворотка, мл** | 0,05 | - | - |
| **Калибратор, мл** | - | 0,05 | - |
| **Вода дистилл., мл** | - | - | 0,05 |

Пробы тщательно перемешать и инкубировать в течение 5 минут при комнатной температуре (+18-25 °С). Измерить оптическую плотность опытной и калибровочной проб против контрольной (холостой) пробы при длине волны 570 (540-590) нм в кювете с длиной оптического пути 1,0 см. Окраска растворов стабильна в течение 20 минут после окончания инкубации при хранении проб в защищённом от света месте при комнатной температуре.

Концентрацию кальция в сыворотке или плазме (С, ммоль/л) рассчитать по формуле:

**С = (Е пробы/Е калибр.) х 2,5ммоль/л**

где: Е пробы – оптическая плотность опытной пробы;Е калибр. – оптическая плотность калибровочной пробы;2,5 – концентрация кальция в Калибраторе, ммоль/л.

Если концентрация кальция в анализируемом образце сыворотки или плазмы крови превышает 3,75 ммоль/л, его следует развести бидистиллированной водой в 2 раза, повторить анализ и полученный результат умножить на 2.

**2.15. Метод определения натрия**

Натрий связывается ионами осаждающего реагента с образованием нерастворимого комплекса. Оставшиеся в растворе ионы осаждающего реагента образуют окрашенное соединение с тиогликолятом. Интенсивность окраски реакционной среды обратно пропорциональна содержанию натрия в исследуемом материале и определяется фотометрически при длине волны 405 (400-410) нм.

**Состав набора:** реагент 1 (осаждающий реагент); реагент 2 (тиогликолят аммония); калибратор – раствор хлорида натрия, 150 ммоль/л.

**Норма:**концентрации натрия в сыворотке и в плазме крови 135-150 ммоль/л.

**Проведение анализа:**

Таблица 17. Схема добавления реактивов для осаждения натрия.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Компоненты реакционной среды** | **Опытная проба** | **Калибровочная проба** | **Контрольная (холостая) проба** |
| **Реагент 1, мл** | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| **Сыворотка крови, мл** | 0,02 | - | - |
| **Калибратор, мл** | - | 0,02 | - |
| **Вода дистилл., мл** | - | - | 0,02 |

Пробы тщательно перемешать и инкубировать 5 минут при комнатной температуре (+18-25 °С); затем снова перемешать в течение 30 секунд и выдержать 30 минут в защищённом от света месте. Осадить центрифугированием все пробы при 900g в течение 10 минут. Для дальнейшего анализа используйте прозрачную надосадочную жидкость (супернатант).

Таблица 18. Схема добавления реактивов для определения активности натрия.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Компоненты реакционной среды** | **Опытная проба** | **Калибровочная проба** | **Контрольная (холостая) проба** |
| **Реагент 2, мл** | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| **Супернатант опытной пробы, мл** | 0,02 | - | - |
| **Супернатант калибровочной пробы, мл** | - | 0,02 | - |
| **Супернатант контрольной пробы, мл** | - | - | 0,02 |

Реакционную смесь тщательно перемешать и инкубировать не менее 5 минут при комнатной температуре (+1825 °С). После окончания инкубации измерить оптическую плотность опытной, калибровочной и контрольной проб против воды при длине волны 405 нм. Окраска растворов стабильна в течение 25 минут после окончания инкубации при хранении проб в защищённом от света месте при комнатной температуре (+18-25 °С).

Расчет концентрации натрия (С, ммоль/л):

**С = ((Е контр.-Е пробы)/ (Е контр.-Е калибр.)) х 150ммоль/л**

где: Е контр. – оптическая плотность контрольной пробы, ед. опт. плотн.;Е пробы – оптическая плотность опытной пробы, ед. опт.плотн.; Е калибр. – оптическая плотность калибратора, ед. опт. плотн.;150 – концентрация натрия в калибраторе, ммоль/л.

**2.16. Метод определения билирубина**

Прямой билирубин непосредственно реагирует с диазотированной сульфаниловой кислотой, а общий билирубин – в присутствии кофеинового реагента, образуя окрашенноеазосоединение, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию билирубина; измеряется фотометрически при длине волны 535 (500-560) нм.

**Состав набора:**кофеиновый реагент; сульфаниловая кислота; натрия нитрит; физиологический раствор; калибратор - 85,5 мкмоль/л (в 2 мл дистилл. воды).

**Норма:** содержания в сыворотке крови: прямого билирубина – до 4 мкмоль/л; общего билирубина – 8,5 - 20,5 мкмоль/л.

**Приготовление рабочего реагента:**смешать необходимые количества сульфаниловой кислоты и натрия нитрита в соотношении 40:1. Полученный рабочий реагент (диазореагент) стабилен не менее 10 дней при +2-8 °С в плотно закрытой посуде из темного стекла или не менее 48 часов при +18-25 °С.

**Приготовление калибратора:**Содержимое флакона с лиофилизатом калибратора растворить в 1,0 мл дистиллированной воды. Концентрация билирубина в полученном растворе калибратора составляет 171 мкмоль/л. Приготовленный калибратор стабилен в защищенном от света месте при +2-8 °С не более 5 дней.

Таблица 19. Схема добавления реактивов для определения активности билирубина.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Компоненты реакционной среды** | **Опытные пробы** | | **Контрольная (холостая) проба** | **Калибровочная проба** |
| **Общ. Бил.** | **Прям. Билл.** |
| **Сыворотка крови, мл** | 0,2 | 0,2 | 0,2 | - |
| **Калибратор, мл** | - | - | - | 0,2 |
| **Физ. раствор, мл** | 0,2 | 1,6 | 1,8 | 0,2 |
| **Кофеиновый реагент, мл** | 1,4 | - | - | 1,4 |
| **Рабочий реагент, мл** | 0,2 | 0,2 | - | 0,2 |

Пробы тщательно перемешать. Для определения прямого билирубина пробу фотометрируют не позднее 5 минут после добавления рабочего реагента. Для определения общего билирубина пробу инкубировать при +18-25 °С в течение 20 минут. Оптическую плотность опытных проб измерить против контрольной (холостой) пробы при длине волны 535 (500-560) нм в кювете с длиной оптического пути 1,0 см. Оптическую плотность калибратора измерить в тех же условиях против дистиллированной воды.

Концентрацию билирубина в сыворотке крови (С, мкмоль/л) рассчитать по формуле:

**С = (Е пробы/Е калибр.) х 171мкмоль/л**

где: Е пробы – оптическая плотность опытной пробы, ед. опт.плотн.; Е калибр. – оптическая плотность калибратора, ед. опт. плотн.; 171 – концентрация билирубина в калибраторе, мкмоль/л.

**2.17. Метод определения мочевины**

Мочевина под действием фермента уреазыгидролизуется с образованием аммиака и двуокиси углерода. Ионы аммония в щелочной среде в присутствии нитропруссида реагируют с фенол-гипохлоритным реагентом, образуя окрашенный комплекс индофенола синего цвета. Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна концентрации мочевины в пробе и измеряется фотометрически при длине волны 540 (520-560) нм.

Мочевина + Н2О = аммиак + CO2

Аммиак + фенол-гипохлорит = индофенол

**Состав набора:**реагент 1 (cтабилизированный раствор уреазы); реагент 2 (фенол-нитропруссид); реагент 3 (гипохлорит); к алибратор – раствор мочевины, 5 ммоль/л (30 мг/100 мл).

**Норма:** содержания мочевины в сыворотке крови 2,5 - 8,3 ммоль/л.

**Проведение анализа:**

Таблица 20. Схема добавления реактивов для определения активности мочевины.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Компоненты реакционной среды** | **Опытная проба** | **Калибровочная проба** | **Контрольная (холостая) проба** |
| **Реагент 1, мл** | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| **Сыворотка крови, мл** | 0,01 | - | - |
| **Калибратор, мл** | - | 0,01 | - |
| **Вода дистилл., мл** | - | - | 0,01 |
| Пробы тщательно перемешать и инкубировать 10 минут при комнатной температуре (+18-25 °С) | | | |
| **Реагент 2, мл** | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| **Реагент 3, мл** | 1,0 | 1,0 | 1,0 |

Пробы тщательно перемешайте и инкубируйте не менее 15 минут при температуре 37 °С. После окончания инкубации выдержите при комнатной температуре 5 минут и измерьте оптическую плотность опытной и калибровочной проб против контрольной пробы при длине волны 540 нм (520-560). Окраска стабильна не менее часа.

Расчет концентрации (С) мочевины в образце:

**С = (Е пробы/Е калибр.) х 5мкмоль/л**

где: Е пробы – изменение оптической плотности исследуемой пробы; Е калибр. – изменение оптической плотности калибровочной пробы; 5 ммоль/л – концентрация мочевины в калибраторе.

**2.18. Метод определения глюкозы**

β-D-глюкоза под действием фермента глюкозооксидазы (GOD) окисляется с образованием эквимолярного количества перекиси водорода. Образующаяся в данной реакции перекись водорода (Н2О2) при участии фермента пероксидазы (POD) способствует окислительномуазосочетанию 4-аминоантипирина (4-ААP) и фенола с образованием окрашенного соединения (хиноними-новый краситель). Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна содержанию глюкозы в исследуемом материале и определяется фотометрически при длине волны 500 (490-540) нм.

β-D-глюкоза + О2 + Н2О = глюконовая кислота + Н2О2

2Н2О2 + 4-ААР + фенол = хинонимин. краситель + 4Н2О

**Состав набора:**реагент 1 (буферный раствор); реагент 2 (лиофилизированная смесь ферментов, хромогенов и стабилизаторов); калибратор – раствор гюкозы, 10 ммоль/л.

**Норма:**содержания глюкозы: в сыворотке или плазме крови 4,2 – 6,1 ммоль/л.

**Подготовка к анализу:**Содержимое одного флакона с Реагентом 2 растворить в содержимом одного флакона с Реагентом 1 при аккуратном перемешивании. Рабочий реагент готов к применению через 2 минуты после полного растворения лиофилизата.

Таблица 21. Схема добавления реактивов для определения активности глюкозы.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Компоненты реакционной среды** | **Опытная проба** | **Калибровочная проба** | **Контрольная (холостая) проба** |
| **Рабочий реагент, мл** | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| **Сыворотка крови, мл** | 0,01 | - | - |
| **Калибратор, мл** | - | 0,01 | - |
| **Вода дистилл., мл** | - | - | 0,01 |

Реакционную смесь тщательно перемешать и инкубировать в течение 20 минут при +37 °С. Измерить оптическую плотность опытной и калибровочной проб против контрольной (холостой) пробы при длине волны 500 (490-540) нм в кювете с длиной оптического пути 1,0 см.

Расчет концентрации глюкозы в крови (С, ммоль/л):

**С = (Е пробы/Е калибр.) х 10мкмоль/л**

где: Е пробы - оптическая плотность исследуемой пробы,Е калибр. - оптическая плотность калибровочной пробы, 10 ммоль/л - концентрация глюкозы в калибраторе.

**2.19. Метод определения триглицеридов**

Определение концентрации триглицеридов основано на проведении ряда сопряжённых ферментативных реакций, катализируемых липазой, глицерокиназой (ГК) в присутствии АТФ, глицеролфосфатоксидазой (ГФО) и пероксидазой (ПО). Образующаяся в ходе данных реакций перекись водорода (H2O2) способствует окислительномуазосочетанию 4-аминоантипирина (4-ААП) и фенола с образованием окрашенного соединения (хинониминовый краситель). Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна содержанию триглицеридов в исследуемом материале и измеряется фотометрически при длине волны 500 (490-520) нм.

Триглицериды = глицерин + жирные кислоты.

Глицерин + АТФ = глицерол-3-фосфат + АДФ.

глицерол-3-фосфат + О2 = диоксиацетонфосфат + Н2О2

2 Н2О2 + 4-ААП + фенол = хинониминовый краситель + 4 Н2O

**Состав набора:**реагент 1; реагент 2; калибратор (калибровочный раствор триглицеридов с концентрацией 2, 29 ммоль/л, в пересчете на триолеин).

**Норма:**содержания триглицеридов в сыворотке или плазме крови 0,34 - 1,71 ммоль/л.

**Подготовка к анализу:**содержимое одного флакона с Реагентом 2 растворить в содержимом одного флакона с Реагентом 1 при аккуратном перемешивании. Рабочий реагент готов к применению через 20 минут после полного растворения лиофилизата.

Таблица 22. Схема добавления реактивов для определения активности триглицеридов.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Компоненты реакционной среды** | **Опытная проба** | **Калибровочная проба** | **Контрольная (холостая) проба** |
| **Рабочий реагент, мл** | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| **Сыворотка крови, мл** | 0,02 | - | - |
| **Калибратор, мл** | - | 0,02 | - |
| **Вода дистилл., мл** | - | - | 0,02 |

Реакционную смесь тщательно перемешать и инкубировать в течение 15 минут при комнатной температуре (+1825 °С) или в течение 10 минут при +37 °С. измерить оптическую плотность опытной и калибровочной проб против контрольной (холостой) пробы при длине волны 500 (490-520) нм в кювете с длиной оптического пути 1,0 см.

Расчет концентрации триглицеридов (С, ммоль/л):

**С = (Е пробы/Е калибр.) х 2,29мкмоль/л**

где: Е пробы – оптическая плотность опытной пробы ед. опт.плотн., Е калибр. – оптическая плотность калибровочной пробы ед. опт. плотн., 2,29 – концентрация триглицеридов в калибраторе, ммоль/л.

Из полученного результата рекомендуется вычесть поправку на содержание свободного глицерина в исследуемых образцах 0,11 ммоль/л.

**Глава 3. Результаты и их обсуждение**

Таблица 23.Активность аспартатаминотрансферазы в сыворотке крови.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Интактная группа,**  **мкмоль/с\*л** | **Контрольная, 2 недели,**  **мкмоль/с\*л** | **Контрольная, 4 недели,**  **мкмоль/с\*л** | **Опытная,**  **2 недели,**  **мкмоль/с\*л** | **Опытная,**  **4 недели,**  **мкмоль/с\*л** |
| 0,0801 | 0,1378 | 0,0901 | 0,0982 | 0,1094 |

Полученные результаты подверглись статистической обработке с привлечением 3s критерия (обнаружение промахов) и t критерия Стьюдента (попарное сравнение средних значений).

Через 2 недели после операции повышена активность аспартатаминотрансферазы в сыворотке крови контрольной группы относительно интактной. Достоверное изменение активности в опытной группе относительно интактной не обнаружено. Через 4 недели АСТ не менялось. Согласно литературным данным повышение аспартатаминотрансферазы может быть связано с применением лекарств, наркозом, хирургическим вмешательством и т.д.

А то, что между контрольной и опытной группой разница в пределах погрешности доказывает, что материал не оказывает токсичного воздействия.

Таблица 24. Активность аланинаминотрансферазы в сыворотке крови**.**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Интактная группа,**  **мкмоль/с\*л** | **Контрольная 2 недели,**  **мкмоль/с\*л** | **Контрольная**  **4 недели,**  **мкмоль/с\*л** | **Опытная**  **2 недели,**  **мкмоль/с\*л** | **Опытная**  **4 недели,**  **мкмоль/с\*л** |
| 0,1128 | 0,1602 | 0,1167 | 0,1305 | 0,1174 |

Полученные результаты подверглись статистической обработке с привлечением 3s критерия (обнаружение промахов) и t критерия Стьюдента (попарное сравнение средних значений).

Через 2 недели после операции повышена активность аланинаминотрансферазы в сыворотке крови контрольной группы относительно интактной. Достоверное изменение активности в опытной группе относительно интактнойне обнаружено. Через 4 недели АЛТ не менялось. Согласно литературным данным повышение аланинаминотрансферазы может быть связано с лекарствами, наркозом, хирургическим вмешательством и т.д.

А то, что между контрольной и опытной группой разница в пределах погрешности доказывает, что материал не оказывает токсичного воздействия.

Таблица 25. Активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Интактная группа,**  **мкмоль/с\*л** | **Контрольная 2 недели,**  **мкмоль/с\*л** | **Контрольная**  **4 недели,**  **мкмоль/с\*л** | **Опытная**  **2 недели,**  **мкмоль/с\*л** | **Опытная**  **4 недели,**  **мкмоль/с\*л** |
| 0,3214 | 0,1177 | 0,0779 | 0,2208 | 0,2206 |

Полученные результаты подверглись статистической обработке с привлечением 3s критерия (обнаружение промахов) и t критерия Стьюдента (попарное сравнение средних значений).

Через 2 недели после операции понижена активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови контрольной группы относительно интактной. Достоверное изменение активности в опытной группе относительно интактной не обнаружено. Через 4 недели ЩФ не менялось. Согласно литературным данным понижение щелочной фосфатазы может быть связано с лекарствами, наркозом, хирургическим вмешательством и т.д.

А то, что между контрольной и опытной группой разница в пределах погрешности доказывает, что материал не оказывает токсичного воздействия.

Таблица 26. Активность гамма-глутамилтрансферазы в сыворотке крови.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Интактная группа,**  **мкмоль/с\*л** | **Контрольная 2 недели,**  **мкмоль/с\*л** | **Контрольная 4 недели, мкмоль/с\*л** | **Опытная**  **2 недели, мкмоль/с\*л** | **Опытная**  **4 недели,мкмоль/с\*л** |
| 0,0518 | 0,0940 | 0,0547 | 0,1068 | 0,0620 |

Полученные результаты подверглись статистической обработке с привлечением 3s критерия (обнаружение промахов) и t критерия Стьюдента (попарное сравнение средних значений).

Через 2 недели после операции повышена активность гамма-глутамилтрансферазы в сыворотке крови контрольной группы относительно интактной. Достоверное изменение активности в опытной группе относительно интактной не обнаружено. Через 4 недели ГГТ не менялось. Согласно литературным данным повышение гамма-глутамиламинотрансферазы может быть связано с лекарствами, наркозом, хирургическим вмешательством и т.д.

А то, что между контрольной и опытной группой разница в пределах погрешности доказывает, что материал не оказывает токсичного воздействия.

Для осуществления белково-азотистого обмена в сыворотке крови определяли концентрацию общего белка, альбумина, мочевины.

Изменения лимфатического обмена оцениваем по уровню триглицеридов и общего холестерина.

Углеводный обмен изучаем по динамике изменения в крови содержания глюкозы.

Минеральный и водно-солевой обмен оценивали по уровню калия, натрия, кальция, хлоридов, неорганического фосфора.

Состояние скелетных мышц оцениваем по активности в сыворотке креатинина.

Таблица 27. Активность глюкозы в сыворотке крови.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Интактная группа,**  **мкмоль/с\*л** | **Контрольная 2 недели,**  **мкмоль/с\*л** | **Контрольная 4 недели, мкмоль/с\*л** | **Опытная**  **2 недели, мкмоль/с\*л** | **Опытная**  **4 недели, мкмоль/с\*л** |
| 10,8587 | 10,6394 | 10,7341 | 10,8687 | 10,8138 |

При сравнении опытных групп относительно интактных и контрольных относительно интактых были выявлены следующие изменения: повышенная концентрация на 1 стадии была вызвана операционным вмешательством.

Отклонения в значениях опытной группы относительно контрольной группы не обнаружено, что свидетельствует об отсутствии влияния биоматериала на биохимические параметры.

Таблица 28. Активность альбумина в сыворотке крови.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Интактная группа,**  **мкмоль/с\*л** | **Контрольная 2 недели,**  **мкмоль/с\*л** | **Контрольная 4 недели, мкмоль/с\*л** | **Опытная**  **2 недели, мкмоль/с\*л** | **Опытная**  **4 недели, мкмоль/с\*л** |
| 30,9958 | 41,6426 | 30,9958 | 39,4878 | 30,327 |

При сравнении опытных групп относительно интактных и контрольных относительно интактных были выявлены следующие изменения: повышенная концентрация на 1 стадии была вызвана операционным вмешательством.

Отклонения в значениях опытной группы относительно контрольной группы не обнаружено, что свидетельствует об отсутствии влияния биоматериала на биохимические параметры.

Таблица 29. Активность холестерина в сыворотке крови.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Интактная группа,**  **мкмоль/с\*л** | **Контрольная 2 недели,**  **мкмоль/с\*л** | **Контрольная 4 недели, мкмоль/с\*л** | **Опытная**  **2 недели, мкмоль/с\*л** | **Опытная**  **4 недели, мкмоль/с\*л** |
| 1,5838 | 1,0948 | 1,6626 | 1,0812 | 1,5023 |

При сравнении опытных групп относительно интактных и контрольных относительно интактных были выявлены следующие изменения: повышенная концентрация на 1 стадии была вызвана операционным вмешательством.

Отклонения в значениях опытной группы относительно контрольной группы не обнаружено, что свидетельствует об отсутствии влияния биоматериала на биохимические параметры.

Таблица 30. Активность триглицеридов в сыворотке крови.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Интактная группа,**  **мкмоль/с\*л** | **Контрольная 2 недели,**  **мкмоль/с\*л** | **Контрольная 4 недели, мкмоль/с\*л** | **Опытная**  **2 недели, мкмоль/с\*л** | **Опытная**  **4 недели, мкмоль/с\*л** |
| 1,5742 | 1,2152 | 1,5473 | 1,1829 | 1,6101 |

При сравнении опытных групп относительно интактных и контрольных относительно интактных были выявлены следующие изменения: повышенная концентрация на 1 стадии была вызвана операционным вмешательством.

Отклонения в значениях опытной группы относительно контрольной группы не обнаружено, что свидетельствует об отсутствии влияния биоматериала на биохимические параметры.

Таблица 31. Активность креатинина в сыворотке крови.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Интактная группа,**  **мкмоль/с\*л** | **Контрольная 2 недели,**  **мкмоль/с\*л** | **Контрольная 4 недели, мкмоль/с\*л** | **Опытная**  **2 недели, мкмоль/с\*л** | **Опытная**  **4 недели, мкмоль/с\*л** |
| 138,1063 | 210,0653 | 142,016 | 215,877 | 145,6087 |

При сравнении опытных групп относительно интактных и контрольных относительно интактых были выявлены следующие изменения: повышенная концентрация на 1 стадии была вызвана операционным вмешательством.

Отклонения в значениях опытной группы относительно контрольной группы не обнаружено, что свидетельствует об отсутствии влияния биоматериала на биохимические параметры.

Таблица 32. Активность мочевины в сыворотке крови.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Интактная группа,**  **мкмоль/с\*л** | **Контрольная 2 недели,**  **мкмоль/с\*л** | **Контрольная 4 недели, мкмоль/с\*л** | **Опытная**  **2 недели, мкмоль/с\*л** | **Опытная**  **4 недели, мкмоль/с\*л** |
| 4,780031667 | 5,732428333 | 4,792526667 | 5,743535 | 4,827235 |

Таблица 33. Активность общего белка в сыворотке крови.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Интактная группа,**  **мкмоль/с\*л** | **Контрольная 2 недели,**  **мкмоль/с\*л** | **Контрольная 4 недели, мкмоль/с\*л** | **Опытная**  **2 недели, мкмоль/с\*л** | **Опытная**  **4 недели, мкмоль/с\*л** |
| 70,7475 | 85,9533 | 71,3864 | 87,1034 | 71,0883 |

При сравнении опытных групп относительно интактных и контрольных относительно интактых были выявлены следующие изменения: повышенная концентрация на 1 стадии была вызвана операционным вмешательством.

Отклонения в значениях опытной группы относительно контрольной группы не обнаружено, что свидетельствует об отсутствии влияния биоматериала на биохимические параметры.

Таблица 34. Активность калия в сыворотке крови.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Интактная группа,**  **мкмоль/с\*л** | **Контрольная 2 недели,**  **мкмоль/с\*л** | **Контрольная 4 недели, мкмоль/с\*л** | **Опытная**  **2 недели, мкмоль/с\*л** | **Опытная**  **4 недели, мкмоль/с\*л** |
| 4,3495 | 4,3377 | 4,3233 | 4,31 | 4,3533 |

При сравнении опытных групп относительно интактных и контрольных относительно интактых были выявлены следующие изменения: повышенная концентрация на 1 стадии была вызвана операционным вмешательством.

Отклонения в значениях опытной группы относительно контрольной группы не обнаружено, что свидетельствует об отсутствии влияния биоматериала на биохимические параметры.

Таблица 35. Активность кальция в сыворотке крови.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Интактная группа,**  **мкмоль/с\*л** | **Контрольная 2 недели,**  **мкмоль/с\*л** | **Контрольная 4 недели, мкмоль/с\*л** | **Опытная**  **2 недели, мкмоль/с\*л** | **Опытная**  **4 недели, мкмоль/с\*л** |
| 1,5742 | 1,2152 | 1,547 | 1,1829 | 1,6101 |

При сравнении опытных групп относительно интактных и контрольных относительно интактых были выявлены следующие изменения: повышенная концентрация на 1 стадии была вызвана операционным вмешательством.

Отклонения в значениях опытной группы относительно контрольной группы не обнаружено, что свидетельствует об отсутствии влияния биоматериала на биохимические параметры.

Таблица 36. Активность натрия в сыворотке крови.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Интактная группа,**  **мкмоль/с\*л** | **Контрольная 2 недели,**  **мкмоль/с\*л** | **Контрольная 4 недели, мкмоль/с\*л** | **Опытная**  **2 недели, мкмоль/с\*л** | **Опытная**  **4 недели, мкмоль/с\*л** |
| 150,7 | 220 | 137,9 | 213,1 | 137,8 |

При сравнении опытных групп относительно интактных и контрольных относительно интактых были выявлены следующие изменения: повышенная концентрация на 1 стадии была вызвана операционным вмешательством.

Отклонения в значениях опытной группы относительно контрольной группы не обнаружено, что свидетельствует об отсутствии влияния биоматериала на биохимические параметры.

Таблица 37. Активность фосфора в сыворотке крови.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Интактная группа,**  **мкмоль/с\*л** | **Контрольная 2 недели,**  **мкмоль/с\*л** | **Контрольная 4 недели, мкмоль/с\*л** | **Опытная**  **2 недели, мкмоль/с\*л** | **Опытная**  **4 недели, мкмоль/с\*л** |
| 1,5742 | 1,2152 | 1,5473 | 1,1829 | 1,6101 |

При сравнении опытных групп относительно интактных и контрольных относительно интактых были выявлены следующие изменения: повышенная концентрация на 1 стадии была вызвана операционным вмешательством.

Отклонения в значениях опытной группы относительно контрольной группы не обнаружено, что свидетельствует об отсутствии влияния биоматериала на биохимические параметры.

Таблица 38. Активность хлора в сыворотке крови.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Интактная группа,**  **мкмоль/с\*л** | **Контрольная 2 недели,**  **мкмоль/с\*л** | **Контрольная 4 недели, мкмоль/с\*л** | **Опытная**  **2 недели, мкмоль/с\*л** | **Опытная**  **4 недели, мкмоль/с\*л** |
| 3,7498 | 3,6714 | 3,7829 | 3,6854 | 3,7202 |

При сравнении опытных групп относительно интактных и контрольных относительно интактных были выявлены следующие изменения: повышенная концентрация на 1 стадии была вызвана операционным вмешательством.

Отклонения в значениях опытной группы относительно контрольной группы не обнаружено, что свидетельствует об отсутствии влияния биоматериала на биохимические параметры.

**Заключение**

В ходе работы мы пришли к следующему:

1. Изучили литературные источники по данной теме;

2. Изучили технику безопасности при работе в химической лаборатории, а так же при работе с реактивами и оборудованием.

3. Изучили технику работы с лабораторными животными.

4. Провели подкожную имплантацию материала.

5. Провели забор крови.

6. Определили биохимические параметры в сыворотке крови крыс.

7. Пришли к выводу, что биоматериал на основе подслизистой тонкой кишки свиньи не оказывает токсичного воздействия.

**Литература**

1. 1.Алекян Б.Г., Машура И., Пурсанов М.Г. Руководство по рентгенэндоваскулярной хирургии сердца и сосудов. Первый в России опыт закрытия дефектов межпредсердной перегородки с использованием «AmplatzerSeptalOccluder»,- Материалы международного симпозиума «Минимально инвазивная хирургия сердца и сосудов». Москва. 1998.
2. 2. ГОСТ Р ИСО 10993. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий.
3. 3. Гюнтер В.Э. Том 10 Имплантаты с памятью формы в сосудистой хирургии.
4. 4. Зараелян А.Г. Аmplatzerсептальныйокклюдер. Техника транскатетерного закрытия дефекта межпредсердной перегородки.
5. 5. Зараелян А.Г.  Клиническая и техническая характеристика Amplatzerсептальногоокклюдера и предшествующих ему протезов для закрытия дефекта межпредсердной перегородки.