

Під редакцією професора Кайдашева І.П.

**МЕТОДИ
КЛІНІЧНИХ ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ
ДОСЛІДЖЕНЬ В МЕДИЦИНІ**

ББК 53.43

М54

УДК 616-092.4/9(07)

Беркало Л.В., Бобович О.В., Боброва Н.О., Гейко О.О.,
Кайдашев І.П., Куценко Л.О., Ножпнова О.А., Рябенко В.В.,
Соколенко В.М., Шинкевич В.І.

М54 Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині
Беркало Л.В., Бобович О.В., Боброва Н.О. і др.; Під ред. Кайдашев
І.П. – Полтава: Полімет, 2003. – 320 с.
ISBN 966-96063-3-0

Рецензент – В.П. Міщенко, доктор медичних наук, завідувач кафедри
нормальної фізіології Української медичної стоматологічної академії

Рекомендовано до друку Вченою радою Української медичної
стоматологічної академії 18.06.2003 р.

ISBN 966-96063-3-0

ББК 53.43

© Беркало Л.В., Бобович О.В., Боброва Н.О.,
Гейко О.О., Кайдашев І.П., Куценко Л.О.,
Ножнинова О.А., Рябенко В.В.,
Соколенко В.М., Шинкевич В.І., 2003
© «Полімет», 2003

**Беркало Л.В., Бобович О.В., Боброва Н.О., Гейко О.О.,
Кайдашев І.П., Куценко Л.О., Ножинова О.А.,
Рябенко В.В., Соколенко В.М., Шинкевич В.І.**

**МЕТОДИ
КЛІНІЧНИХ ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ
ДОСЛІДЖЕНЬ В МЕДИЦИНІ**

**Полтава
«Полімет»
2003**

Друге видання посібника "Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині" має розширений спектр методик, доповнене новим розділом – молекулярна біологія.

В посібнику надано основи лабораторних досліджень імунітету, гемостазу, вільнорадикального окислення, методи гістологічних та біохімічних досліджень. Велику увагу приділено відтворенню експериментальних патологій, контролю їх розвитку та експериментальної терапії. Значне місце займають методи які можуть бути використані для проведення доклінічного вивчення нових лікарських засобів (зроблена спроба адаптації до системи GLP). Посібник розраховано на наукових працівників різних галузей фармакології, біології та медицини.

Цей посібник з'явився в результаті багаторічної роботи Центральної науководослідної лабораторії Української медичної стоматологічної академії (м.Полтава), що надає йому певної тематичної і методологічної спрямованості. 60-90 роки стали часом пріоритетного розвитку методів і засобів лабораторної діагностики, різко збільшився об'єм імунологічних, токсикологічних досліджень, стали широко застосовуватись методи молекулярної біології. Разом з тим, лавиноподібне наростання методів лабораторних досліджень, збільшення асортименту вітчизняної і іноземної літератури, поява реактивів різних виробників підняли питання уніфікації і стандартизації проведення досліджень.

Кожному науковому працівнику, який займається лабораторними дослідженнями, відомо, що від методики, яка описана в літературі, до конкретного лабораторного виконання лежить величезний шлях по-перше «налагодження» методики, по-друге, узгодження загальноприйнятої норми з даними конкретної лабораторії. Особливо це стосується нових або маловідомих методів.

Який же можливий вихід із такої ситуації? Як нам здається, рішення цієї проблеми лежить в написанні стандартних методик проведення досліджень. Цей термін повинен передбачати, що забір крові, підготовка посуду і реактивів, самі реактиви, апаратура повинні бути стандартними. Тому ми вважали за необхідне включити в опис методик ГОСТи і ТУ матеріалів, реактивів, посуду і апаратури, що використовувались. Це повинно суттєво полегшити написання і виконання методик молодими дослідниками.

Значну увагу приділено також методикам відтворення експериментальних патологій, так як в літературі найчастіше описується лише основний принцип. Наведені також критерії ймовірності розвитку експериментальних патологій.

Основною перевагою цього посібника є те, що всі викладені методи виконувались авторами і доведені до 100 % відтворюваності.

Автори з подякою приймуть критичні зауваження як по набору методів дослідження, так і по характеру їх описання.

РОЗДІЛ I. МЕТОДИ ПРОВЕДЕННЯ ГЕМАТОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ГЕМОГЛОБІНУ С (набір «Біо – Lасbeta – Test», Чехія)

ПРИНЦИП МЕТОДУ

У буферному середовищі, до складу якого входить ферриціанід та ціанід калію, із еритроцитів виділяється гемоглобін і трансформується в стабільний гемоглобінціанід, який фотометрують.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Пробірки центрифужні місткістю 10 мл, ГОСТ 1770-74
2. Піпетки скляні градуйовані місткістю 5 мл, 2-й клас, ГОСТ 20292-74
3. Колби мірні місткістю 1000 мл, ГОСТ 1770-74
4. Дозатор піпетковий П1-0,02, ТУ 64-1-33і29-81
5. Штатив пластмасовий ЩПП 02-40, ТУ 64-1-2669-83
6. Колориметр фотоелектричний концентраційний КФК-2-УХЛ 4.2, ТУ 3-3.1766-82

РЕАКТИВИ

1. N-метил-D-глюкаміновий буфер 2,22 ммоль (ціанід калія 1,54 ммоль, ферриціанід калія 1,09 ммоль – 1 флакон)р
2. Італон гемоглобіну.

РОЗЧИНИ

Нін іповлення робочого розчину: вміст флакону розчинити в 2000 мл дистильованої води. Розчин зберігати 1 місяць при температурі +2-4° С в

темному місці

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

Виконання вимірювання без використання стандарту.

В пробірку налити 5 мл робочого розчину.

В цю пробірку внести 0,02 мл крові, суміш негайно перемішати.

Через 10 хв виміряти оптичну густину проби проти робочого розчину Довжина хвилі 540 – 546 нм, кювета 1 см. Концентрацію гемоглобіну р'озфахувати за формулою: гемоглобін (г/л) = 367,7 иАІ де А1- екстинкція проби.

Виконання вимірювання з використанням стандарту.

При аналогічних умовах, як при вимірюванні пробні, прямо в кювету вилити вміст ампули з гемоглобіновим стандартом та виміряти оптичну густина (A_s). Концентрацію гемоглобіну розрахувати за формулою:

$$\text{гемоглобін (г/л)} = a \cdot 251 \cdot A_s / A_{251}$$

де a – концентрація гемоглобіну в г/л в гемоглобіновому стандарті, який вказаний на етикетці ампули із набору; 251 – розведення крові.

Нормальні значення: чоловіки – 125-175 г/л

жінки – 115-155 г/л

Література: van Kampen E.J., Zijlstra W.G.: Clin. Chim. Acta 6, 538 (1961); Chromy V., Valickova M., Hulc V., Babjuk J.S.: Z. med. Labor.-Diagn. 18, 106 (1977)

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ЧИСЛА ЕРИТРОЦИТІВ В КРОВІ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Основою є підрахунок еритроцитів в 1 л крові при постійному розведенні крові і визначеному об'ємі камери для підрахунку.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Мікроскоп біокулярний Биолам Р11, (Ломо, Росія).
2. Камера Горяєва з покривним склом
3. Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74
4. Піпетки скляні градузовані місткістю 5мл II клас, ГОСТ 20292 – 74
5. Терези електронні ВЛ Е-134, ГОСТ 24104-88
6. Штатив поліетиленовий для пробірок ШПП 02-40 ТУ 64-1-2669-83
7. Клавішний лічильник для підрахунку формених елементів крові; (ЗМА, Київ)

РЕАКТИВИ

Хлорид натрію кваліфікація «сда», ГОСТ 4233-77

РОЗЧИНИ

0,9 % (0,15 М) розчин хлориду натрію: 8,78 г хлориду натрію, зважити з точністю до 0,005 г, розчинити в дистильованій воді в мірній колбі місткістю 1000 мл, долити дистильовану воду до об'єму приблизно 950 мл, ретельно перемішати, долити водою до мітки і ще раз перемішати. Зберігати в холодильнику при температурі 8-10° С одну добу.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. В суху чисту пробірку налити 4 мл розчину хлориду натрію, куди додати 0,02 мл цільної крові з пальця (слідкувати, щоб на зовнішніх стінках камери

- не залишалось слідів крові). Вміст пробірки старанно змішати.
2. Готувати камеру для підрахунку, для чого старанно притерти шліфоване скло до камери. Після цього одну краплю приготованої суспензії внести в щілину, що утворилася між склом і камерою.
3. Камеру залишити на 1 хв. для осідання формених елементів. Підрахунок вести під мікроскопом при прикритій діафрагмі і дещо опущеному конденсорі (об'єктив *8, окуляр *10 або 15).
- Еритроцити рахувати в 5 великих квадратах по діагоналі (5x16 = 80 малих квадратів). Підрахунок підлягають еритроцити, що лежать в самому малому квадраті на лівій та верхній його межах.

Результат отримують шляхом множення числа еритроцитів в 5 великих квадратах (80 малих) на 10^{10} , при цьому результат виражають в кількості клітин на 1 л крові ($\times 10^{12}$ /л).

Примітка: Для більш чіткого підрахунку рекомендується рахувати еритроцити в 2 сітках.

Література. Методические указания по применению унифицированных общин-ческих лабораторных методов исследования / Под ред. проф. В.В. Александрова. - М.: Медицина, 1987. - С. 29.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ЧИСЛА ЛЕЙКОЦИТІВ В КРОВІ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Метод оснований на підрахунку лейкоцитів в 1 л крові при постійному розведенні крові у визначеному об'ємі камери для підрахунку.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Дистор піпетковий П1-0,02, П1-0,5 ТУ 64-1-3329-81
2. Камера Горяева з накривним склом
3. Банка мірна місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74
4. Співвіднілий вічильник для підрахунку формених елементів крові, (ЗМА, Київ)
5. Мікроскоп бінокулярний Биолам Р11, (Ломо, Росія), окуляр 7х, мікроскоп 10х
6. Шпатель скляна градуйована місткістю 5 мл, ГОСТ 1770-74
7. Центрифуги мірні центрифужні, ГОСТ 1770-74
8. Шпатель цинкостигмелловий для пробірок ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669-83

РЕАКТИВИ

1. Рідинка синьий патрій (25000 од. в 5 мл), ("Reanal", Угорщина)
2. Рідинка зелена оцтова, кваліфікація «хч» ГОСТ 61-75
3. Рідинка повисаний, ТУ 6-09-29-76

РОЗЧИНИ

5% розчин оцтової кислоти, підфарбований метиленовим синім.

Вмірну колбу місткістю 100 мл заповнити 5 мл льодяної оцтової кислоти і довести об'єм до 100 мл дистильованою водою. Для додавання розчину світло синього кольору необхідно додати 1 кристал метиленового спільного. Розчин стійкий.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. Дозатором піпетковим внести в пробірку 0,4 мл 5 % розчину оцтової кислоти, підфарбованої метиленовим синім, додати до нього 0,02 мл цільної крові, ретельно перемішати піпетуванням. Пробірку залишити до моменту підрахунку не більше, ніж 4 години.

2. Приготувати підрахункову камеру: протерти насухо камеру і покривне скло. Притерти скло до камери, злегка натиснувши на нього, щоб по краю скла з'явилися райдужні кільця.

3. Заповнити підрахункову камеру розведеною кров'ю. Для цього скляною паличкою відібрати краплю розведеної крові і піднести її до краю покривного скла, слідкувати за тим, щоб кров без бульбашок повітря рівномірно заповнила всю поверхню сітки, не затікаючи в канавки.

4. Для осідання лейкоцитів заповнену камеру залишити в горизонтальному положенні на одну хв.

5. Камеру помістити на столик мікроскопа і підрахувати кількість лейкоцитів в двох паралелях у 100 великих квадратах на малому збільшенні (окуляр 7х, об'єктив 10х) починаючи з верхнього лівого кута сітки. Розрахунок числа лейкоцитів проводити за формулою:

$$X = a \times 50,$$

де X – число лейкоцитів в 1 мкл крові, a – число лейкоцитів в 100 великих квадратах. Брати середнє значення. Розбіг результатів не повинен перевищувати 5 %. Результат виражати у вигляді $a \times 10^9/л$.

Нормальні значення: Кількість лейкоцитів у щурів: $5-25,6 \times 10^9/л$,

у здорових людей: $4,5 - 9,5 \times 10^9/л$.

Література. Методическіе указания по применению унифицированных клинических лабораторных методов исследования / Под ред. проф. В.В. Меньшикова, М.: Медицина, 1987. - С. 36.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ЧИСЛА ЛІМФОЦИТІВ В МАЗКАХ КРОВІ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Метод ґрунтується на вибірковому фарбуванні об'єктів, кислими та лужними барвинками. (Кислий барвінок – еозин, лужний - азур).

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Клавішний лічильник для підрахунку формених елементів крові; (ЗМА, Київ)
2. Мікроскоп біокулярний Биолам Р11, (Ломо, Росія), об'єктив 90х, окуляр 7х
3. Предметне скельце, ГОСТ 9289-59
4. Простий олівець
5. Стакан хімічний місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74
6. Циліндр мірний місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74

РЕАКТИВИ

1. Спирт етиловий 96°, ГОСТ 5962-67;
2. Ефір для наркозу стабілізований, (м. Шостка, Україна)
3. Імерсійне масло, ТУ 13-028172-16-87
4. Фарба Романовського-Гімза, ТУ 6-09-07-1463-85
5. Фарба-фіксатор Мая-Грюнвальда, (Диахим-Гемистейн-М, С.-Петербург)

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. На предметне скло нанести невелику краплю крові. Скло залишити в горизонтальному стані, за допомогою шліфованого скла під кутом 45° розсунути цю краплю крові. Не треба сильно надавлювати на скло, щоб не травмувати формені елементи.
2. Шкелі висушити на повітрі, маркувати простим олівцем. Мазок повинен бути тонким, жовтуватого кольору і закінчуватися «мікропунктом».
3. Шкелі, що висохли фіксують фарбою фіксатором Мая-Грюнвальда протягом 10 хв.
4. На штек додати 0,5 мл дистильованої води і залишити на 10 хв в розчині дистильованою водою. Висушити при кімнатній температурі.
5. Пофарбувати фарбою Романовського-Гімзи. На 1мл дистильованої води додають 1 краплю фарби. Залишити на 20 – 30 хв. Змити фарбу дистильованою водою. Висушити при кімнатній температурі.
6. За допомогою мікроскопу підрахувати формені елементи крові. Не забувши підрахувати 100 лейкоцитів. Підрахунок проводити так: 3-5 разів від краю мазка, 3-5 полів зору під прямим кутом до краю мазка і т.д. Таким чином, скло рухати по зигзагу (лінія «меандра»). Не забувши приблизно половини клітин, змінити сторону мазка, який підраховується.

Відомості про лабораторні методи дослідження в клініці / Под ред. проф. В.В. Савченка. М. Медицина, - 1987. - С.124-125.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ЛЕКТИН- ПЕРОКСИДАЗНОГО ЗАБАРВЛЕННЯ ПОВЕРХНЕВИХ ГЛІКОПРОТЕЇДІВ ЛЕЙКОЦИТІВ (модифікація)

ПРИНЦИП МЕТОДУ

В основі методу лежить специфічність лектин-рецепторного розпізнавання конканаваліном-А мембранних структур, які містять вуглеводну детермінанту - манозу. Конканавалін-А сполучається з пероксидазою, яка при взаємодії з 3,3'-діамінобензидином утворює темно-коричневий преципітат. За допомогою визначення експресії глікопротеїдів з вуглеводним залишком D-манози можна дати оцінку функціонального стану лейкоцитів.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Центрифужні пробірки, ГОСТ 1770-74
2. Циліндри мірні місткістю 50 мл, ГОСТ 1770-74
3. Хімічні стакани місткістю 50 мл, ГОСТ 1770-74.
4. Колби мірні місткістю 100, 1000 мл, ГОСТ 1770-74
5. Мікроскоп біокулярний Биолам Р11, (Ломо, Росія), об'єктив 90х, окуляр 7х1.
6. Секундомір тип СОС пр. – 26-2-000, ТУ 23-1894. 003-90
7. Аналітичні ваги ВЛР-200, ГОСТ 19491-74
8. Терези електронні ВЛ Е-134, ГОСТ 24104-88
9. Піпетки скляні градуйовані місткістю 5, 10 мл, 2-й клас, ГОСТ 20292-74
10. Папір фільтрувальний, ГОСТ 12026-76
11. Предметні скельця, ГОСТ 9289-59
12. Клавішний лічильник для підрахунку формених елементів крові. (ЗМА, Київ)
13. Сушильна шафа В-151, ТУ 64-1-1111-72
14. Чашки Петрі, ТУ 64-2-19-78
15. Холодильник побутовий, ТУ 84-89
16. Штатив поліетиленовий для пробірок ШППО2-40, ТУ 64-1-2669-83
17. рН-метр-мілівольтметр, тип рН-150, ГОСТ 22261-82

РЕАКТИВИ

1. Хлорид натрію, кваліфікація "чда", ГОСТ 4328-77
2. Хлорид калію, кваліфікація "хч", ГОСТ 4234-77
3. Фосфорнокислий натрій двозаміщений, кваліфікація "чд", ТУ 64-64 77
4. Кислота соляна кислота концентрована, кваліфікація "ч", ГОСТ 3118 77
5. Конканавалін-А, (НПК «Лектинотест»)
6. Пероксидаза хрому, ("Reanal", Угорщина)
7. Спирт етиловий 96°, ГОСТ 5962-67

8. Ефір для наркозу стабілізований (м. Шостка, Україна)
9. 3,3-діамінобензидин тетрагідрохлорид ("Chemapol", Чехія)
10. Перекис водню, кваліфікація "чда", ГОСТ 10929-76
11. Сафранін ("Chemapol", Чехія)
12. Сіліконова олія
13. Хлороформ, кваліфікація "хч", ТУ 6-09-06-800-76
14. Гепарин 25000 ОД («Reanal», Угорщина).

РОЗЧИНИ

1. Забуферений ізотонічний розчин (ЗІР) рН 7,4: в мірну колбу 1000 мл кількісно перенести послідовно, кожний раз розмішуючи, наважки реактивів, зважених з точністю до 0,005 г: 8 г хлориду натрію, 0,2 г хлориду калію, 1 г фосфорнокислого натрію двозаміщеного. Перемішати і розчинити, додаючи дистильовану воду до мітки на мірній колбі, перевірити рН і розчинити. В разі необхідності довести рН до значення 7,4, додаючи обережно невеликі порції 1 н соляну кислоту. Зберігати у холодильнику при температурі 4 С протягом двох тижнів.

І н соляна кислота: 8.95 мл концентрованої соляної кислоти, що містить 100 мг іонів, перенести у мірну колбу на 100 мл, долити до мітки дистильовану воду, перемішати.

Конканавалін-А (Кон-А) 100 мкг/мл; наважку Кон-А 500 мкг, зважену з точністю до 0,0001 г, розчинити в 5 мл буферу ЗІР. Зберігати у морозильній камері.

Конваналін-А (Кон-А) 30 мкг/мл: готується з розчину Кон-А 100 мкг/мл/заморозити розчин Кон-А 100 мкг/мл, відібрати 0,3 мл та розчинити в 10 мл буферу ЗІР. Готувати перед використанням.

Інші іїдаза хрому 30 мкг/мл: наважку пероксидази 500 мкг, зважену з точністю до 0,0001 г, розчинити в 1,7 мл буферу ЗІР. Готувати перед використанням.

Суміш Нікіфорова змішати ефір та 96° спирту пропорціях 1:1. Зберігати при температурі + 4° С, термін зберігання необмежений. 0,005% розчин 3,3-діамінобензидинатетрагідрохлориду: наважку 3,3-

діамінобензидину масою 0,05 г, зважену з точністю 0,0001 г, розчинити в 10 мл буферу ЗІР. Готувати за тиждень до використання, зберігати у холодильнику при температурі 4 С.

0,015% перекис водню: 0,38 мл 33 % перекису водню розчинити у 0,62 мл дистильованої води. Готувати перед використанням. 0,01% розчин сафраніну: наважку сафраніну 0,01 г, зважену з точністю 0,0005 г розчинити у 0,99 мл дистильованої води.

Розчин для сіліконування пробірок: змішати 1 ч сіліконового масла та 10 ч хлороформу перемішати. Термін зберігання обмежений.

ХІД ВИКОНАННЯ

1. 0,5 мл крові стабілізувати гепарином (0,05 мл), нанести на предметне скельце для закріплення лейкоцитів і помістити у вологу камеру (на дно чашки Петрі помістити змочений у дистильованій воді фільтрувальний папір). Інкубувати 60 хв.
2. В двох змінах буферу ЗІР обережно промити препарати, підсушити в потоці повітря.
3. Зафіксувати у суміші Нікіфорова 5 хв.
4. Нанести на препарати по 0,05 мл Кон-А 30 мкг/мл і помістити у вологу камеру на 30 хв. Відмити у двох порціях розчину Кон-А.
5. Для виявлення Кон-А на препарати нанести 0,05 мл пероксидази 30 мкг/мл. Інкубувати у вологій камері 30 хв. Відмити у двох порціях буферу ЗІР.
6. Активність пероксидази виявити шляхом нанесення на препарати 0,05 мл розчину для виявлення поверхневих глікопротеїдів з D-манозою.
7. Реакцію зупинити зануренням препаратів в дистильовану воду на 2 хв. Препарати висушити в потоці повітря.
8. Ядра лейкоцитів дофарбувати в 0,01 % розчині сафраніну 1 хв.
9. Гранули, що утворились, рахувати за допомогою мікроскопу по середньому цитохімічному коефіцієнту окремо для кожного виду лейкоцитів за формулою:

$$\text{СЦК} = \frac{1a+2b+3v+4g + 5d}{100}, \text{ де}$$

а – кількість клітин без гранул;

б - кількість клітин, що містять від 1 до 5 гранул;

в - кількість клітин, заповнених гранулами на 25%;

г - кількість клітин, заповнених гранулами на 50-75%;

д - кількість клітин, заповнених гранулами на 100%.

Примітка: центрифужні пробірки перед використанням необхідно сіліконувати. Для цього змочити внутрішню поверхню пробірок розчином для сіліконування і помістити пробірки в сушильну шафу на 2 години при температурі 160° С.

Література: 1. Пат. 45149 А України МПК 6185/14. Спосіб оцінки функціонального стану лейкоцитів. - Боброва Н.О., Кайдашев І.П. - № 2001063710; Заявл. 01.06.2001; Опубл. 15.03.2002; Бюл. № - 2. Луцик А.Д., Детюк Е.С., Луцик М.Д. Лектини в гистохимії. - Львов: Изд-во Львовського університета, 1989. - С. 27-31.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ЛЕКТИН- ЗМІЄЖНОЇ ГЕМАГЛЮТИНАЦІЇ ЕРИТРОЦИТІВ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Використовується спорідненість окремих лектинів до кінцевих цукроводних залишків білків, які розташовані на еритроцитарних мембранах і виконують роль рецепторів.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Чашки Петрі, ТУ 64-2-19-79
2. Центрифуга ОПН-3 УХЛ 4.2, ТУ 5-375-42-60-76
3. Планшет 96-лунковий для імунологічних реакцій, ТУ 64-2-278-79
4. Дозатори піпеточні ГВ 200 87 4564, сс 0777, FP 500
5. Пробірки центрифужні ШПП - 02 - 40 ГОСТ 17-70-74
6. Терези лабораторні ВЛР-200, 2 клас ГОСТ 19491-74

РЕАКТИВИ

1. Хлорид натрію, кваліфікація "ч", ТУ 6-09-3658-74
2. Стандартні препарати лектинів насіння лимської квасолі (ЛНЛК), насіння пшениці (ЛНЧ), зародків пшениці (ЛЗП), бобовника анагеролистного (ЛБА) (ІНКО «Лектино-тест», м. Львів).

РОЗЧИНИ

1. 0,15 М розчин хлориду натрію: у мірну колбу місткістю 100 мл внести наважку 0,9 г хлориду натрію, зважену з точністю до 0,005 г, долити дистильованою водою до мітки, перемішати.
2. Розчини лектинів готують *ex tempore*: наважку 1 мг лектину, зважену з точністю до 0,005 г, розчинити в 2 мл 0,15 М розчину хлориду натрію, перемішати.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. Взяти 1 мл крові, стабілізованої 3,8 % розчином цитрату натрію, тричі відмити 0,15 М розчином хлориду натрію. В центрифужну пробірку внести 1 мл крові, довести об'єм рідини 0,15 М розчином хлориду натрію до 10 мл і центрифугувати при 1500 об/хв на протязі 10 хв, потім обережно відібрати супернатант і вилити геть. Повторити три рази.
2. В чашці Петрі 0,5 мл осаду еритроцитів ресуспендувати в 24,5 мл 0,15 М розчину хлориду натрію.
3. В стандартний планшет для імунологічних реакцій внести в кожну лунку по 0,05 мл 0,15 М розчину хлориду натрію (одного планшету достатньо для одночасного дослідження 3 проб еритроцитів).

4. Потім в перші лунки вертикальних рядів внести по 0,05 мл розчину відповідного лектину. Після чого провести кратні розведення (титр), переносячи 0,05 мл вмісту 1 лунки в другу лунку і т.д., при цьому старанно перемішувати вміст лунок. З останньої лунки 0,05 мл вилити геть.

5. Внести в кожен лунку 4-х вертикальних рядів (для одного дослідження) 0,05 мл суспензії еритроцитів проби, старанно перемішати вміст лунок. Після цього планшет з пробамі інкубувати при кімнатній температурі 35-45 хв. Облік результатів проводити візуально, підрахувати кількість балів аглютинації в лунках кожного вертикального ряду.

Для бальної оцінки повну аглютинацію вважають за 3 бали; аглютинацію, при якій аглютинати покривають 2/3 лунки - 2 бали, якщо аглютинати покривають 1/3 лунки - 1 бал, відсутність аглютинації - 0 балів.

Таким чином, бал аглютинації прямо пропорційно відображає ступінь аглютинації еритроцитів. Згідно робіт Roth, число місць зв'язування для лектинів обернено пропорційне мірі їх аглютинації.

Література: 1. Кайдашев І.П. Вплив поверхневих глікопротеїдів еритроцитів на взаємодію їх мембран з нейтрофільними лейкоцитами та лімфоцитами. Дис... канд. мед. наук. - Полтава, 1996. - 220 с. - 2. Беркало Л.В. Вікові особливості взаємодії еритроцитів та лейкоцитів крові людини: Автореф. дис. канд. біол. наук: 05.03.99 / Ін-т свинарства УААН. - Полтава, 1999. - 16с. - 3. Спосіб діагностики ураження стоволових клітин червоного кісткового мозку несприятливими факторами зовнішнього та внутрішнього середовища / Рішення про видачу патента N 94052071 від 23.03.95 р.

РОЗДІЛ 2. МЕТОДИ ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ ГЕМОСТАЗУ

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ЗАБОРУ ТА ОБРОБКИ КРОВІ ДЛЯ КОАГУЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Точність та відтворюваність коагуляційних досліджень в значній мірі залежать від дотримання правил забору та стабілізації крові.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Центрифуга ОПН-3 УХЛ 4.2 ТУ 5-375-42-60-76
2. Дозатор піпетковий ПІ-0,2, ТУ 64-1-3329-81
3. Колба мірна місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74
4. Шприц ін'єкційний ("Луер"), ТУ – У 64 - 00480922-25-96
5. Секундомір тип СОС пр. – 26-2-00. ТУ 23-1894.003-90
6. Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74
7. Штативи для пробірок поліетиленові ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669-83
8. Холодильник побутовий, ТУ 84-89
9. Терези електронні ВЛ Е –134, 2-й клас ГОСТ 104-88;

РЕАКТИВИ

Цитрат натрію, кваліфікації «ч» ГОСТ 22280-76

РОЗЧИНИ

3,8 % тризаміщений цитрат натрію: в колбу місткістю 100 мл внести наважку тризаміщеного цитрату натрію 3,8 г, зваженого з точністю 0,005 г та додати 96,2 мл дистильованої води. Ретельно перемішати. Зберігати в темному прохолодному місці.

ТЕХНІКА ЗАБОРУ КРОВІ

Кров у хворого брати натщесерце із вени гострою сухою голкою з широким діаметром без шприца. В якості стабілізатора використовувати 3,8 % розчин тризаміщеного цитрату натрію, що забезпечує стабільність факторів згортання крові в плазмі. При взятті крові перші 5-6 крапель відкидати і кров, що вільно витікає з голки, набрати в пробірку до відмітки. Швидко додати необхідну кількість стабілізатора. Пробірку закрити пробкою і повільними рухами перемішати кров з антикоагулянтом, щоб запобігти гемолізу еритроцитів.

Важливою умовою для отримання правильних показників гемостазу є дотримання співвідношення об'ємів крові та стабілізатора (9 об'ємів крові з води змішати з 1 об'ємом 3,8 % тризаміщеного цитрату натрію при нормальних показниках гематокриту). При більших відхиленнях показника гематокриту від норми, це співвідношення змінюється: чим вище величина гематокриту тим менше потрібно антикоагулянту (див. табл. розрахунку).

Показник гематокриту, %	Розчин антикоагулянту, мл	Об'єм крові разом з антикоагулянтом, мл
20	1,4	10
22-26	1,3	10
28-32	1,2	10
34-38	1,1	10
40-44	1,0	10
46-50	0,9	10
52-56	0,8	10
58-60	0,7	10
Більше 65	0,5	10
Для новонароджених	0,25	5

Зразки крові повинні зберігатися при температурі $+4 - +8^{\circ} \text{C}$. Таке охолодження гальмує активацію як системи зсідання крові, так і фібринолізу, але не запобігає виходу із кров'яних пластинок в плазму тромбоцитарних факторів згортання. Кров і плазма з ознаками гемолізу для досліджень системи зсідання крові не допускається. Протягом 60 хв зразки крові слід відцентрифугувати: для отримання тромбоцитарної плазми – 5 хв при 1500 об/хв., для безтромбоцитарної – 10 хв при 3000 об/хв. Надосадову рідину обережно відібрати. Потім пробірки щільно закрити пробками, щоб запобігти дії вуглекислого газу і підвищення рН середовища. Плазму використовувати на протязі 2 годин.

Література: 1. Лабораторные методы исследований в клинике / Под ред. проф. В.В.Меньшикова.- М.: Медицина.-1987.-364 с. – 2. Качество лабораторного анализа / Под ред. проф. В.В.Меньшикова.- М.: Лабинформ.-1997.-С. 116-123.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ АГРЕГАЦІЙНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ТРОМБОЦИТІВ ПРИНЦИП МЕТОДУ

Після внесення агрегуючого агенту (індуктора) до багатові на тромбоцити плазми, яка знаходиться в кюветі агрегометра, утворюються агрегати. В результаті різко зменшується кількість вільних тромбоцитів і знижується початкова оптична густина, тобто підвищується трансмісія. Зміна оптичної густини фіксується за допомогою фотоелектроколориметра.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Центрифуга ОПН-3 УХЛ 4.2 ТУ 5-375-42-60-76
2. Термостат ТС-80, ТУ 64-1-1317-80
3. Дозатор піпетковий П1-0,2, ТУ 64-1-3329-81
4. Терези лабораторні ВЛР-200 2 клас ГОСТ 19491-74
5. Колби мірні місткістю 100, 1000 мл, ГОСТ 1770-74;
6. Секундомір тип СОС пр. – 26-2-00. ТУ 23-1894.003-90
7. Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74
8. Штативи для пробірок поліетиленові ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669-83
9. Лампа настільна
10. Колориметр фотоелектричний концентраційний КФК-2-УХЛ 4.2, ТУ 1766-82 (в кришку якого вбудовано силіконову мішалку зі швидкістю 270 об/хв).
11. Водяна баня, ("Bio Mark" Inc, м. Львів, Україна)

РЕАКТИВИ

1. Натрій хлористий, кваліфікація "ч", ТУ 6-09-3658-74
2. Аденозин-5'-дифосфорна кислота динатрієва сіль (АДФ), («Reanal», Венгрія)

РОЗЧИНИ

1. 0,15 М розчин хлориду натрію: у мірну колбу місткістю 100 мл внести навпажку 0,9 г натрію хлориду, зваженого з точністю 0,005 г, та долити дистильованої води до мітки.

2. Розчин АДФ:

а) приготування маточного розчину: до 2 мг АДФ, зваженого з точністю 0,005 г, додати 2 мл 0,15 М розчину хлориду натрію. Кінцева концентрація приготованого таким чином розчину АДФ дорівнює 100 мкг/мл.

б) приготування робочого розчину в розведенні 1:20: до 0,05 мл маточного розчину додати 0,95 мл 0,15 М розчину хлориду натрію. Зберігати: основний розчин протягом 1 місяця при температурі -20°С. Його можна розморожувати і знову заморожувати. Розведення повинно бути завжди свіжим і потрібно тримати розчин під час досліджень при температурі +4°С.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. В кювету КФК-2 (5 мм) помістити 1,5 мл тромбоцитарної плазми.
2. В плазму занурити мішалку, встановити КФК-2 на «0» відносно дистильованої води.
3. Включити мішалку. Зафіксувати початкову оптичну густину.
4. Внести 0,1 мл розчину АДФ. Показники оптичної густини фіксувати через 15 с, а після 2 хв агрегації - через 30 с,
5. Побудувати криву агрегації тромбоцитів.

Читання результатів: Про ступінь агрегації слід судити по величині зниження оптичної густини.

По кривій визначити наступні показники:

1) Час максимальної агрегації (в хв) - з моменту внесення агрегуючого агента до вершини кривої агрегатограми, що характеризує ступінь агрегації в нормі ступінь агрегації - 10-15 хв.

2) Кут агрегації - величина, що відображає швидкість появи агрегації, яка визначається крутизною підйому кривої агрегатограми після внесення індуктора агрегації.

В нормі кут агрегації - 50-70 град.

3) Тривалість латентного періоду - величина, що відображає процеси, які не рееструються КФК-2.

В нормі тривалість латентного періоду - 15-45 с.

4) Висота агрегації - величина, яка відображає ступінь агрегації і відповідає величині зменшення оптичної густини тромбоцитарної плазми в ході агрегації. В нормі висота агрегації - 4-6 см.

5) СІАТ (сумарний індекс агрегації тромбоцитів) - інтегруючий показник визначення агрегації тромбоцитів.

В нормі СІАТ - 55 - 75 %.

$$СІАТ = \frac{E_1 - E_2}{E_1 - E_{\text{бідн}}} \times 100\%$$

E_1 - оптична густина плазми багатой на тромбоцити;

E_2 - оптична густина плазми після агрегації

$E_{\text{бідн}}$ - оптична густина плазми бідной на тромбоцити

Література: Люсов В.А., Белоусов Ю.Б. Метод графической регистрации агрегации тромбоцитов и изменение ее при ишемической болезни сердца // Лаб. дело. - 1971. - № 8. - С. 459-461.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ЧАСУ РЕКАЛЬЦИФІКАЦІЇ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

В стабілізованій крові вільні іони кальцію зв'язуються стабілізатором і кров не здатна до зсідання. При внесенні розчину хлориду кальцію в кров знову з'являються вільні іони кальцію, що повертає їй здатність до коагуляції.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Центрифуга ОПН-3 УХЛ 4.2, ТУ 5-375-42-60-76
2. Термостат ТС-80, ТУ64-1-1317-80
3. Дозатор піпетковий П1-0,2, ТУ 64-1-3329-81
4. Секундомір тип СОС пр. - 26-2-00. ТУ 23-1894.003-90

5. Штативи для пробірок поліетиленові ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669-83
6. Терези електронні ВЛ Е -134, 2-й клас ГОСТ 104-88;
7. Колба мірна місткістю 100 мл ГОСТ 1770-74;
8. Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74
9. Лампа настільна
10. Водяна баня, ("Bio Mark" Inc, м. Львів, Україна)

РЕАКТИВИ

Хлорид кальцію, кваліфікація "ч", ТУ 6-09-4711-81

РОЗЧИНИ

0,025 М розчин хлориду кальцію: (готувати із сухого прожареного хлориду кальцію). В мірну колбу місткістю 100 мл внести наважку 277 мг хлориду кальцію, зваженого з точністю до 0,005 г, та додати 99,723 мл дистильованої води. Ретельно перемішати. Зберігати в темному прохолодному місці.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. В центрифужну пробірку внести 0,2 мл досліджуваної плазми і прогріти на водяній бані на протязі 1 хв при температурі 37° С.
2. Внести 0,2 мл розчину хлориду кальцію і одночасно ввімкнути секундомір. Відмити час утворення згустку при періодичному помішуванні.

Читання результату: Тест здатний виявити глибокі порушення системи гемостазу, передозування антикоагулянтів, різкий дефіцит плазмених факторів зсідання крові. Час рекальцифікації скорочується на першій стадії ДВС-синдрому, та збільшується на стадії «коагулопатії використання».

В нормі час рекальцифікації – 80 -120 с.

Література: Bergerhof H. D., Roka L. Estimation of plasma resalcification time // Zschr. Vitamin-Hormon und Fermentforsch.-1954.-N 6.- P.25-39.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ТРОМБІНОВОГО ЧАСУ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Внесення в досліджувану плазму розчину тромбіну супроводжується переходом фібриногену в фібрин з утворенням згустку.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Центрифуга ОПН-3 УХЛ 4.2, ТУ 5-375-42-60-76
2. Термостат ТС-80, ТУ64-1-1317-80
3. Терези електронні ВЛ Е -134, 2-й клас ГОСТ 104-88;

4. Колба мірна місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74;
5. Пробірки центрифужні ГОСТ 1770-74
6. Лампа настільна
7. Дозатор піпетковий ПІ-0,2, ТУ 64-1-3329-81
8. Секундомір тип СОС пр. – 26-2-00, ТУ 23-1894.003-90
9. Штативи для пробірок поліетиленові ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669-83
10. Водяна баня, ("Bio Mark" Inc, м. Львів, Україна)

РЕАКТИВИ

У відповідності з набором («Bio Mark», Inc м. Львів, Україна) або з іншими окремими реагентами:

1. Ліофілізований препарат тромбіну людини 150 од. НІН
2. Хлорид натрію, кваліфікація "ч", ТУ 6-09-3658-74

РОЗЧИНИ

1. Підготовка розчину тромбіну: до вмісту флакону «Тромбін людини» додати 10 мл 0,15 М розчину натрію хлориду. Тестувати активність розчину тромбіну по нормальній донорській плазмі (див. хід визначення). Розчин тромбіну повинен володіти активністю 12-14 с. Стабільність розчину тромбіну при: +15 - 25° С - 24 год.

+ 2 - 8° С - 40 год.

- 10 - 20° С - 2 неділі.

2. 0,15 М розчин натрію хлориду: у мірну колбу місткістю 100 мл внести наважку 0,9 г натрію хлориду, зваженого з точністю до 0,005 г, та додати дистильованої води до мітки.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. В центрифужну пробірку внести 0,2 мл досліджуваної плазми і прогріти на водяній бані на протязі 1 хв при температурі 37° С.

2. Після чого внести 0,2 мл розчину тромбіну і одночасно ввімкнути секундомір. Відмітити час утворення згустку при періодичному помішуванні.

Читання результатів: Тромбіновий час подовжується при гіпофібриногенемії, надлишку в плазмі антитромбіну, наявності продуктів фібринолізу, при деяких молекулярних аномаліях фібриногену. Незначне збільшення тромбінового часу можливе при різко вираженій гіперфібриногенемії та при наявності у плазмі парапротейнів. Повне незсідання плазми під впливом тромбіну спостерігається при значній гілергепаринемії і в гострій фазі ДВС-синдрому.

В нормі тромбіновий час - 12-14 с.

Література: Biggs R.M., Macfarlane R.G. Blood coagulation and its disorders. Blackwell.-Oxford.-1962.-586 p.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ПРОТРОМБІНОВОГО ЧАСУ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Плазма рекальцифікується в присутності тромбoplastину, при цьому максимумно активується зовнішній шлях коагуляції. Швидкість утворення фібринового згустку визначається в основному рівнем протромбіну.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Центрифуга ОПН-3 УХЛ 4.2 ТУ 5-375-42-60-76
2. Термостат ТС-80, ТУ 64-1-1317-80
3. Пробірки центрифужні ГОСТ 1770-74
4. Лампа настільна
5. Фарфорова ступка з товкачиком
6. Дозатор піпетковий П1-0,2, ТУ 64-1-3329-81
7. Секундомір тип СОС пр. – 26-2-00. ТУ 23-1894.003-90
8. Штативи для пробірок поліетиленові ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669-83
9. Колба мірна місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74
10. Водяна баня, ("Bio Mark" Inc, м. Львів, Україна)

РЕАКТИВИ

У відповідності з набором («Bio Mark», Inc м. Львів, Україна) або з іншими окремими реагентами:

1. Хлорид натрію, кваліфікація "ч", ТУ 6-09-3658-74
2. Хлорид кальцію, кваліфікація "ч", ТУ 6-09-4711-81

РОЗЧИНИ

1. 0,15 М розчину натрію хлориду: у мірну колбу місткістю 100 мл внести наважку 0,9 г натрію хлориду, зваженого з точністю 0,005 г, та додати дистильованої води до мітки, перемішати.
2. 0,025 М розчин хлориду кальцію: (готувати із сухого прожареного хлориду кальцію) В мірну колбу місткістю 100 мл внести наважку 277 мг хлориду кальцію, зваженого з точністю 0,005 г, та додати 99,723 мл дистильованої води. Ретельно перемішати. Зберігати в темному прохолодному місці.
3. Розчин тромбoplastину: для його приготування використовувати сухий порошок тромбoplastину. Наважку 100 мг сухого тромбoplastину, зваженого з точністю 0,005 г, розтерти з 5 мл 0,9% розчину натрію хлориду, інкубувати на водяній бані при температурі 37° С на протязі 30 хв. Центрифугувати 5 хв при 1500 об/хв. Надосадову рідину відібрати в флакон і використовувати для роботи. Тестувати по нормальній донорській

плазмі (див. хід визначення). Активність тромбопластину по Квіку 15 с. Залишок реактиву зберігати при температурі -10-20° С на протязі 2 тижнів.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. В центрифужну пробірку внести 0,1 мл досліджуваної плазми і 0,1 мл суспензії тромбопластину
2. Прогріти на водяній бані на протязі 1 хв. при температурі 37° С
3. Після чого внести 0,1 мл розчину хлориду кальцію і одночасно ввімкнути секундомір. Відмітити час утворення згустку при періодичному помішуванні.

Читання результатів: Подовження протромбінового часу (при нормальному вмісті фібриногену і нормальному тромбіновому часі) спостерігається при вродженій чи набутій недостатності одного або кількох факторів протромбінового комплексу (факторів VII, X, V чи II), при складних вражешнях паренхіми печінки і недостатності вітаміну К. Одночасне подовження тромбінового часу свідчить про гіпо- або дисфібриногенемію, або надлишок в крові антикоагулянтів: гепарину, продуктів фібринолізу та інше.

В нормі протромбіновий час - 14-24 с.

Література: Quick A.J. Hemorrhagic diseases and thrombosis//2 nd ed. Philadelphia, 1966.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ КЕФАЛІН-КАОЛІНОВОГО ЧАСУ В ПЛАЗМІ КРОВІ (АПТЧ - активований парціальний тромбопластиновий час)

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Визначається час рекальцифікації бідної тромбоцитами цитратної плазми в умовах стандартизованої фосфоліпідної (кефаліном) та контактної (каоліном) активації процесу зсідання.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Центрифуга ОПН-3 УХЛ 4.2 ТУ 5-375-42-60-76
2. Термостат ТС-80, ТУ 64-1-1317-80
3. Терези електронні ВЛ Е -134, 2-й клас ГОСТ 104-88;
4. Колба мірна місткістю 100 мл ГОСТ 1770-74;
5. Пробірки центрифужні ГОСТ 1770-74
6. Лампа настільна
7. Фарфорова ступка з товкачиком
8. Апарат для стряхування розчинів

9. Дозатор піпетковий ПІ-0,2, ТУ 64-1-3329-81
10. Секундомір тип СОС пр. – 26-2-00. ТУ 23-1894.003-90
11. Штативи для пробірок поліетиленові ШПП 02-40, ТУ 1-2669-83
12. Холодильник побутовий, ТУ 84-89

РЕАКТИВИ

У відповідності з набором («Віо Марк», Інс м. Львів, Україна) або з іншими окремими реагентами:

1. Хлорид натрію, кваліфікація "ч", ТУ 6-09-3658-74
2. Хлорид кальцію, кваліфікація "ч", ТУ 6-09-4711-81
3. Буфер Міхаеліса
4. Мозковий тромбопластин людини або кроля
5. Каолін
6. Хлороформ, кваліфікація «ч», ТУ 6-09-06-800-76

РОЗЧИНИ

1. 0,15 М розчин хлориду натрію: у мірну колбу місткістю 100 мл внести наважку 0,9 г натрію хлориду, зваженого з точністю 0,005 г та долити дистильованої води до мітки, перемішати.
2. 0,025 М розчин хлориду кальцію: (готувати із сухого прожареного хлориду кальцію) В мірну колбу місткістю 100 мл внести наважку 277 мг хлориду кальцію, зваженого з точністю до 0,005 г, та додати 99,723 мл дистильованої води. Ретельно перемішати. Зберігати в темному прохолодному місці.
3. Маточна суспензія кефаліну на буфері Міхаеліса активності 60-70 с: готувати із мозкового тромбопластину людини або кролика. Методика приготування по W.N.Bell, H. Alton, 1954. До 1 г подрібненого в порошокподібного стану мозкового тромбопластину прилити 50 мл хлороформу. Старанно перемішати і на протязі 2 годин струшувати в апараті. Суспензію профільтрувати, фільтрат випарити при температурі 56° С (або 37° С). Із сухого осаду приготувати 3 або 1 суспензію кефаліну, для чого 300 мг його старанно розмішати відповідно в 10 або 30 мл фізіологічного розчину. Суспензію розфасувати по 1-2 мл в флакони, які потім герметично закрити. Зберігати в замороженому вигляді при температурі - 20° С на протязі 6-12 місяців. Розморожені флакони при повторному заморожуванні не підлягають.
4. Робоча суспензія кефаліну: вміст флакону розморозити і розвести буфером Міхаеліса або 0,15 М розчином хлориду натрію таким чином, щоб кефаліновий час (див. нижче) бідної на тромбоцити нормальної плазми був менше за 70 с. Перевірити і нерозведену емульсію із флакону. Кефаліновий час якої повинен бути в декілька разів довший за протромбіновий час плазми. Якщо нерозведена емульсія дає дуже короткий час зсідання крові, то

це говорить про недостатнє вивільнення кефаліну від активного тканинного тромбопластину. Якщо кефаліновий час занадто довгий, то це свідчить про недостатню екстракцію хлорофор-мом, або про дуже розведену суспензію.

5. Суспензія каоліну 5 мг/мл в буфері Міхаеліса: старанно подрібнити в ступці каолін, протерти через складену вдвоє капронову тканину, залити дистильованою водою, збовтати, центрифугувати 30 хв при 3000 об/хв. Воду злити, каолін висушити при температурі +120°С і знову подрібнити в ступці. Приготувати наважки каоліну і зберігати в закупорених флаконах.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. В центрифужну пробірку внести 0,1 мл досліджуваної плазми, 0,1 мл кефаліну і 0,1 мл суспензії каоліну.
2. Прогріти на водяній бані на протязі 2 хв при періодичному помішуванні через кожні 10 с для забезпечення максимальної контактної активації.
3. Внести 0,1 мл 0,025 М розчину хлориду кальцію і одночасно ввімкнути секундомір. Відмітити час утворення згустку при періодичному помішуванні.

Читання результатів: Кефалін-каоліновий час - високостандартизована коагуляційна проба, чутлива тільки до плазменних дефектів зсідання, особливо до дефіциту в плазмі XII, XI, IX і VIII факторів, а також до надлишку антикоагулянтів.

В пормі показники активованого парціального тромбопластинового часу - 45-55 с

Література: 1. Biggs R. Human blood coagulation. Haemostasis and trombosis. Blackwell, Oxford. -1976.-600 p. – 2. Баркаган З.С. Геморрагические заболевания и синдромы. - М.: Медицина, 1980.- 528 с.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ КАОЛІНОВОГО ЧАСУ В ПЛАЗМІ КРОВІ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Визначається час рекальцифікації тромбоцитарної цитратної плазми в умовах стандартизованої контактної активації процесу каоліном.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Центрифуга ОПН-3У ХЛ 4.2 ТУ 5-375-42-60-76
2. Термостат ТС-80, ТУ 64-1-1317-80
3. Терези електронні ВЛ Е -134, 2-й клас ГОСТ 104-88;
4. Колба мірна місткістю 100 мл ГОСТ 1770-74;
5. Пробірки центрифужні ГОСТ 1770-74
6. Лампа настільна
7. Фарфорова ступка з товчачиком

8. Апарат для стряхування розчинів
9. Дозатор піпетковий ПІ-0,2, ТУ 64-1-3329-81
10. Секундомір тип СОС пр. – 26-2-00. ТУ 23-1894.003-90
11. Штативи для пробірок поліетиленові ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669-83
12. Водяна баня, ("Bio Mark" Inc, м. Львів, Україна)

РЕАКТИВИ

У відповідності з набором («Bio Mark», Inc м. Львів, Україна) або з іншими окремими реагентами:

1. Хлорид натрію, кваліфікація "ч", ТУ 6-09-3658-74
2. Хлорид кальцію, кваліфікація "ч", ТУ 6-09-4711-81
3. Буфер Міхаеліса
4. Каолін

РОЗЧИНИ

1. 0,15 М розчин натрію хлориду: у мірну колбу місткістю 100 мл внести наважку 0,9 г натрію хлориду, зважену з точністю 0,005 г, додати дистильованої води до мітки.

2. 0,025 М розчин хлориду кальцію: (готувати із сухого прожареного хлориду кальцію) В мірну колбу місткістю 100 мл внести наважку 277 мг хлориду кальцію, зважену з точністю 0,005 г, розчинити у 99,723 мл дистильованої води. Ретельно перемішати. Зберігати в темному прохолодному місці.

3. Суспензія каоліну 25 мг/мл в буфері Міхаеліса: старанно подрібнити в ступці каолін, протерти через складену вдвоє капронову тканину, залити дистильованою водою, збовтати, центрифугувати 30 хв при 3000 об/хв. Воду злити, каолін висушити при температурі +120°С і знову подрібнити в ступці. Приготувати наважки каоліну і зберігати в закупорених флаконах.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. В центрифужну пробірку внести 0,1 мл досліджуваної плазми і 0,1 мл суспензії каоліну, прогріти на водяній бані при температурі 37°С на протязі 1 хв.

2. Внести - 0,1 мл 0,025 М розчину хлориду кальцію і одночасно ввімкнути секундомір. Відмітити час утворення згустку при періодичному помішуванні.

Читання результатів: Каоліновий час подовжується тільки при дефіциті плазмених факторів, які приймають участь у внутрішньому механізмі зсідання крові, або при надлишку в плазмі антикоагулянтів.

В нормі каоліновий час - 45 - 50 с.

Література: Лабораторные методы исследования системы гемостаза / Балуда И.П., Баркаган З.С., Гольдберг Е.Д. и др.-Томск.-1980.- 304 с.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ КЕФАЛІНОВОГО ЧАСУ В ПЛАЗМІ КРОВІ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Визначається час рекальцифікації бідної тромбоцитами цитратної плазми в умовах оптимальної активації процесу кефаліном або іншими замінниками фактору III тромбоцитів. Внесення кефаліну чи його аналогів виключає порушення з'єднання тромбоцитарного генезу і робить тест особливо чутливим до дефіциту плазмених факторів з'єднання і до надлишку в крові антикоагулянтів. Принцип цього методу використовується в усіх методиках, завдяки яким відбувається диференціація дефіциту плазмених факторів тромбопластинуотворення, або проводиться їх кількісне визначення.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Центрифуга ОПН-3 УХЛ 4.2, ТУ 5-375-42-60-76
2. Термостат ТС-80, ТУ 64-1-1317-80
3. Терези електронні ВЛ Е -134, 2-й клас ГОСТ 104-88;
4. Колба мірна місткістю 100 мл ГОСТ 1770-74;
5. Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74
6. Лампа настільна
7. Фарфорова ступка з товкачиком
8. Апарат для стяхування розчинів
9. Дозатор піпетковий ПІ-0,2, ТУ 64-1-3329-81
10. Секундомір тип СОС пр. - 26-2-00. ТУ 23-1894.003-90
11. Штативи для пробірок поліетиленові ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669-83
12. Водяна баня, ("Bio Mark" Inc, м. Львів, Україна)

РЕАКТИВИ:

1. Хлорид натрію, кваліфікація "ч", ТУ 6-09-3658-74
2. Хлорид кальцію, кваліфікація "ч", ТУ 6-09-4711-81
3. Буфер Міхаеліса
4. Мозковий тромбопластин людини або кролика
5. Хлороформ, кваліфікація «ч», ТУ 6-09-06-800-76

РОЗЧИНИ

1. 0,15 М розчин натрію хлориду: у мірну колбу місткістю 100 мл внести наважку 0,9 г натрію хлориду, зважену з точністю до 0,005 г, додатково дистильованої води до мітки, перемішати.
2. 0,025 М розчин хлориду кальцію: (готувати із сухого прожареного хлориду кальцію) В мірну колбу місткістю 100 мл внести наважку 277 мг хлориду

нію, зваженого з точністю до 0,005 г, додати 99,723 мл дистильованої води. Ретельно перемішати. Зберігати в темному прохолодному місці.

Маточна суспензія кефаліну на буфері Міхаеліса, активністю 60-70 с: готувати із мозкового тромбопластину людини або кролика. Методика виготовлення по W.N.Bell, H.Alton, 1954. До 1 г подрібненого в ступці до трішкোলодібного стану мозкового тромбопластину прилити 50 мл триформу. Старанно перемішати їх і на протязі 2 год. струшувати в апараті. Суспензію профільтрувати, фільтрат випарити при температурі + 56° С (або 130° С). Із сухого осаду готувати 3 або 1% суспензію кефаліну, для чого 300 мг осаду старанно розмішати відповідно в 10 або 30 мл розчину натрію хлориду. Суспензію розфасувати по 1-2 мл в флакони, які потім герметично закрити. Зберігати в замороженому вигляді при температурі -20° С на протязі 6-12 місяців. Розморожені флакони повторному заморожуванню не підлягають.

Робоча суспензія кефаліну: вміст флакону розморозити і розвести буфером Міхаеліса або 0,15 М розчином натрію хлориду таким чином, щоб кефаліновий час (див. нижче) бідної на тромбоцити нормальної плазми був менше за 70 с. Перевірити і нерозведену емульсію із флакону, кефаліновий час якої повинен бути в декілька разів довший за протром-біновий час тієї ж плазми. Якщо нерозведена емульсія дає дуже короткий час зсідання крові, то це говорить про недостатнє вивільнення кефаліну від активності тканинного мозкового тромбопластину. Якщо кефаліновий час занадто довгий, то це свідчить про недостатню екстракцію хлороформом або про дуже розведену суспензію.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

В центрифужну пробірку внести 0,1 мл досліджуваної плазми і 0,1 мл суспензії кефаліну, перемішати.

Прогріти на водяній бані при температурі 37° С на протязі 1 хв, після чого внести - 0,1 мл розчину хлориду кальцію і одночасно ввікнути секундомір. Відмітити час утворення згустку при періодичному помішуванні.

Читання результатів: Кефаліновий час подовжується тільки при відсутності плазменних факторів, які приймають участь у внутрішньому механізмі зсідання крові, або при надлишку в плазмі антикоагулянтів.

В нормі кефаліновий час - 60-70 с.

Література: Баркаган З.С. Геморрагические заболевания и синдромы.- М.: Медицина, 1980.- 528 с.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ФАКТОРУ У

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Визначення швидкості зсідання бідної ас-глобуліном старої плазми при додаванні до неї розведеної досліджуваної плазми. Чим вища концентрація

фактору V в досліджуваній плазмі, тим більше скорочується час Квіку старої плазми.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Центрифуга ОПН-3 УХЛ 4.2 ТУ 5-375-42-60-76
2. Термостат ТС-80, ТУ 64-1-1317-80
3. Терези електронні ВЛ Е -134, 2-й клас ГОСТ 104-88;
4. Колба мірна місткістю 100 мл. ГОСТ 1770-74;
5. Пробірки центрифужні ГОСТ 1770-74
6. Лампа настільна
7. Фарфорова ступка з товкачиком
8. Дозатор піпетковий ПІ-0,2, ТУ 64-1-3329-81
9. Секундомір тип СОС пр. - 26-2-00. ТУ 23-1894.003-90
10. Штативи для пробірок поліетиленові ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669-83
11. Водяна баня, ("Bio Mark" Inc, м. Львів, Україна)

РЕАКТИВИ

У відповідності з набором («Bio Mark», Inc м. Львів, Україна) або з іншими окремими реагентами:

1. Хлорид натрію, кваліфікація "ч", ТУ 6-09-3658-74
2. Хлорид кальцію, кваліфікація "ч", ТУ 6-09-4711-81
3. Тромбопластин

РОЗЧИНИ

1. 0,15 М розчин натрію хлориду: у мірну колбу місткістю 100 мл внести наважку 0,9 г натрію хлориду, зважену з точністю до 0,005 г, додати дистильованої води до мітки.
2. 0,025 М розчин хлориду кальцію: (готувати із сухого прожареного хлориду кальцію) В мірну колбу місткістю 100 мл внести наважку 277 мг хлориду кальцію, зважену з точністю до 0,005 г, додати 99,723 мл дистильованої води. Ретельно перемішати. Зберігати в темному прохолодному місці.
3. Розчин тромбопластину: наважку 100 мг сухого тромбопластину, зважену з точністю до 0,005 г, розтерти з 5 мл 0,9% розчину натрію хлориду, інкубувати на водяній бані при температурі 37° С на протязі 30 хв. Потім центрифугувати 5 хв при 1500 об/хв. Надосадову рідину відібрати в флакон і використовувати для роботи. Тестувати по нормальній донорській плазмі (див. хід визначення). Активність по Квіку 15 сек. Залишок реактиву зберігати при температурі -10-20° С на протязі 2 тижнів.
4. Донорська плазма зі зниженою активністю фактору V (використовувати плазму яка зберігалася на менше 2 тижнів при температурі + 4° С, або плазму яку інкубували при температурі +37° С на протязі 48 год., тому що фактор V руйнується при температурі + 4° С за 2 тижні, а при +37° С - за 48 год.).

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. Центрифужну пробірку внести 0,1 мл старої донорської плазми і 0,1 мл розведеної (1:20 фізіологічним розчином) досліджуваної плазми.

2. Пробірку помістити на водяну баню при температурі 37° С на 1 хв, після чого швидко внести 0,1 мл тромбoplastин-кальцієвої суміші і відмітити час зсідання плазми.

Ас-глобулін (А) у відсотках вирахувати по формулі:

$$A = \frac{B}{B} \times 100\%$$

де В - час зсідання плазми донора; В - час зсідання дослідної плазми.

За час зсідання плазми донора прийняти середнє арифметичнє визначенє у здорових донорів.

Розрахунок можна проводити по стандартній кривій вмісту Ас-глобуліну в плазмі здорових людей. Зробити розведення плазми 10 здорових донорів (1:20, 1:40, 1:60, 1:80, 1:100). Визначити час зсідання плазми отриманих розведень методом, що приведений вище і вирахувати середні величини кожного розведення. Середню величину протромбінового часу плазми, розведеної 1:20 прийняти за 100% вмісту Ас-глобуліну, а отому в розведенні 1:100 - за 20%. Отриманий результат відобразити у вигляді графіка, на якому по горизонтальній осі відкласти вміст Ас-глобуліна в відсотках, по вертикальній - протромбіновий час.

Література: 1. Лабораторные методы исследования системы гемостаза / Бануда В.П., Баркаган З.С., Гольдберг Е.Д. и др.-Томск, 1980.- 304 с. - 2. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования / Под ред. проф. Е.А. Кост.-М.: Медицина, 1975.- 205 с.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ТРОМБІНОВОГО ЧАСУ МІКРОМЕТОДОМ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Внесення в досліджувану плазму розчину тромбіну супроводжується переходом фібриногену в фібрин з утворенням згустку.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Центрифуга ОПН-3 УХЛ 4.2 ТУ 5-375-42-60-76
2. Термостат ТС-80, ТУ 64-1-1317-80
3. Терези електронні ВЛ Е -134, 2-й клас ГОСТ 104-88;
4. Колба мірна місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74;
5. Чашка Петрі, ТУ 64-2-19-78

6. Лампа настільна
7. Дозатор піпетковий ПІ-0,2, ТУ 64-1-3329-81
8. Секундомір тип СОС пр. – 26-2-00. ТУ 23-1894.003-90
9. Штативи для пробірок полістиленові ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669-83
10. Водяна баня, ("Bio Mark" Inc, м. Львів, Україна)

РЕАКТИВИ

У відповідності з набором фірми («Bio Mark», Inc м. Львів, Україна) або з іншими окремими реагентами:

1. Ліофілізований препарат тромбіну людини 150 од. NIH
2. Хлорид натрію, кваліфікація "ч", ТУ 6-09-3658-74

РОЗЧИНИ

1. Підготовка розчину тромбіну: до вмісту флакону «Тромбін людини» додати 10 мл 0,15 М розчину хлориду натрію. Тестувати активність розчину тромбіну по нормальній донорській плазмі (див. хід визначення). Розчин тромбіну повинен мати активність 12-14 с. Стабільність розчину тромбіну при: +15 - 25° С - 24 год.

+2 - 8° С - 40 год.

-10 - 20° С - 2 неділі.

2. 0,15 М розчин натрію хлориду: у мірну колбу місткістю 100 мл внести наважку 0,9 г натрію хлориду, зважену з точністю до 0,005 г, та долити дистильованої води до мітки.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. На чашку Петрі капнути 0,02 мл досліджуваної плазми і прогріти на водяній бані при +37° С на протязі 1 хв.

2. Внести 0,02 мл розчину тромбіну і одночасно ввімкнути секундомір. Відмітити час утворення згустку періодично піддвіваючи його голкою.

Читання результатів: Тромбіновий час подовжується при гіпофібриногенемії, надлишку в плазмі антитромбіну, наявності продуктів фібринолізу, при деяких молекулярних аномаліях фібриногену. Незначне збільшення тромбінового часу можливе при різко вираженій гіперфібриногенемії та при наявності у плазмі парапротейнів. Повне незідання плазми під впливом тромбіну спостерігається при значній гіпергепааринемії і в гострій фазі ДВС-синдрому.

У нормі тромбіновий час: для дорослих – 12-14 с., для новонароджених – 16-19 с.

Література: 1. Biggs R.M., Macfarlane R.G. Blood coagulation and its disorders. Blackwell.-Oxford.-1962.-586 р. 2. Патент України. Спосіб оцінки системи згортання у новонароджених. Знаменська Т.К., Осинська Л.Ф., Жданович О.І., Куріліна Т.В. Заяв.№ 98073907 від 20.07.98

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ФІБРИНОГЕНУ В ПЛАЗМІ КРОВІ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

До розведеної цитратної плазми додати розчин тромбіну і відмітити час утворення фібринового згустку. При надлишку тромбіну, час утворення згустку залежить від концентрації фібриногену, яку визначають по калібровочній кривій.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Центрифуга ОПН-3 УХЛ 4.2, ТУ 5-375-42-60-76
2. Термостат ТС-80, ТУ 64-1-1317-80
3. Терези електронні ВЛ Е -134, 2-й клас ГОСТ 104-88;
4. Колба мірна місткістю 100 мл ГОСТ 1770-74;
5. Пробірки центрифужні ГОСТ 1770-74
6. Лампа настільна
7. Дозатор автоматичний поршневий медичний А-2, ТУ 64-1-2828-81
8. Дозатор піпетковий ПІ-0,2, ТУ 64-1-3329-81
9. Секундомір тип СОС лр. - 26-2-00. ТУ 23-1894.003-90
10. Штативи для пробірок поліетиленові ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669-83
11. Водяна баня, ("Bio Mark" Inc, м. Львів, Україна)

РЕАКТИВИ

У відповідності з набором («Bio Mark», Inc м. Львів, Україна) або з іншими окремими реагентами:

1. Тромбін людини - 4 фл. по 100 од. НІН
2. 0,15 М розчин хлориду натрія - 1 фл. 12 мл.
3. Буфер Міхаеліса - 60 мл

РОЗЧИНИ

Підготовка розчину тромбіну: зміст флакону «Тромбін людини» розчинити в 3 мл 0,15 М розчину хлориду натрія. Стабільність отриманого розчину при температурі + 20° С - 24 год., при температурі +4° С - 48 год., при температурі - 10-20 - 2 тижні.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. Пробу готувати безпосередньо перед використанням. В центрифужну пробірку внести 0,1 мл досліджуваної плазми та 0,9 мл буфера Міхаеліса, добре змішати.
2. Відібрати 0,2 мл цієї суміші в пробірку і прогріти 1 хв на водяній бані при температурі 37° С.

3. Додати 0,2 мл розчину тромбіну і одночасно ввімкнути секундомір. Відмітити час утворення тонких ниток фібрину або невеликого згустку.

Оцінка і читання результату: концентрацію фібриногену визначити по калібровочній кривій, що додається. Оптимальна площа визначення лежить в межах 8-20 сек. Зниження концентрації фібриногену спостерігається при вроджених а (гіпо-) фібриногенеміях, при вторинних порушеннях синтезу фібриногену, при ДВС-синдромі. Підвищення концентрації фібриногену спостерігається при інфаркті міокарда, гострих інфекціях, опіках, дифузних хворобах сполучної тканини та в деяких випадках мієломи.

За даними каліброваної кривої:

6 с становить 7,1 г/л,	15 с становить 2,7 г/л,
7 с становить 6,1 г/л,	16 с становить 2,5 г/л,
8 с становить 5,2 г/л,	17 с становить 2,35 г/л,
9 с становить 4,7 г/л,	18 с становить 2,2 г/л,
10 с становить 4,2 г/л,	19 с становить 2,1 г/л,
11 с становить 3,75 г/л,	20 с становить 1,95 г/л,
12 с становить 3,4 г/л,	21 с становить 1,85 г/л,
13 с становить 3,1 г/л,	22 с становить 1,75 г/л,
14 с становить 2,9 г/л,	23 с становить 1,65 г/л,

В нормі концентрація фібриногену - 1,5-4,5 г/л.

Література: Лабораторные методы исследования системы гемостаза / Балуд В.П., Баркаган З.С., Гольдберг Е.Д. и др.-Томск, 1980.- 304 с.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ФАКТОРУ XIII

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Базується на визначенні часу розчинення згустку фібрину в розчині кислоти оксалатної сечовини після додавання до реагуючої суміші монохлоридної кислоти, яка частково блокує активність фактору XII (фібрінази). Час розчинення згустку залежить від активності фактору XII плазми, що досліджується.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Центрифуга ОПН-3 УХЛ 4.2, ТУ 5-375-42-60-76
2. Термостат ТС-80, ТУ 64-1-1317-80
3. Терези електронні ВЛ Е -134, 2-й клас ГОСТ 104-88;
4. Колба мірна місткістю 100 мл ГОСТ 1770-74;
5. Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74
6. Лампа настільна
7. Дозатор піпетковий П1-0,2, ТУ 64-1-3329-81

8. Секундомір тип СОС пр. – 26-2-00. ТУ 23-1894.003-90
9. Шпатель для пробірок поліетиленові ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669-83

РЕАКТИВИ:

У відповідності з набором («Bio Mark», Інс м. Львів, Україна) або з іншими окремими реагентами:

1. Моноіодоцтова кислота
2. Кисла оксалатна сечовина
3. Хлорид кальцію, кваліфікація "ч", ТУ 6-09-4711-81

РОЗЧИНИ

1. 0,025 М розчин хлориду кальцію (готувати із сухого прокаленого хлориду кальцію): в мірну колбу місткістю внести наважку 277 мг хлориду кальцію, зважену з точністю до 0,005 г, додати 99,723 мл дистильованої води. Ретельно перемішати. Зберігати в темному прохолодному місці.
2. 0,5 % розчин моноіодоцтової кислоти: в мірну колбу місткістю 100 мл внести наважку 0,5 г моноіодоцтової кислоти, зваженої з точністю до 0,005 г, та долити дистильованої води до мітки.
3. 0,12 % розчин кислоти оксалатної сечовини: в мірну колбу місткістю 100 мл внести наважку 0,12 г кислоти оксалатної сечовини, зваженої з точністю до 0,005 г, розчинити у дистильованій воді, довести об'єм до мітки, перемішати.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. До 0,2 мл плазми додати 0,1 мл розчину моноіодоцтової кислоти і 0,4 мл розчину хлориду кальцію.
2. Струшуючи пробірку, перемішати її вміст і залишити на 20 хв при кімнатній температурі.
3. До згустку, що утворився додати 2 мл розчину кислоти оксалатної сечовини.
4. Постійно струшуючи пробірки, визначити час повного розчинення фібринового згустку паралельно в двох пробірках для кожної проби і обчислити середній час розчинення згустку.

Розрахунок показників: активність фактору XIII дослідної плазми обчислити по формулі:

$$A\Phi = \frac{A \times 100}{B}$$

де: А – час лізису фібрину дослідної плазми. В - час лізису фібрину плазми здорових людей.

Нормальні показники: Лізіс згустку відбувається за 70,6+15,0 с, що відповідає 100%, коливання - 50-100 с.

Примітка. Якщо різко порушена перша фаза зсідання крові (при гемофільї), для утворення згустку до плазми окрім хлориду кальцію

необхідно додати 0,1 мл тромбіну активністю 20 с. Активність фібрину необхідно визначати при температурі +20° С або +37° С.

Література: Лабораторные методы исследования системы гемостаза / Бал В.П., Баркаган З.С., Гольдберг Е.Д. и др.-Томск, 1980.- 304 с.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ФІБРИНОЛІТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ МЕТОДОМ ЛІЗИСУ ЕУГЛОБУЛІНІВ ПЛАЗМИ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Час розчинення згустку, встановлений по лізису еуглобулінової фракції, відображає фібринолітичну активність плазми, звільненої від інгібіторів.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Центрифуга ОПН-3 УХЛ 4.2 , ТУ 5-375-42-60-76
2. Термостат ТС-80, ТУ 64-1-1317-80
3. Терези електронні ВЛ Е -134, 2-й клас ГОСТ 104-88;
4. Колби мірні місткістю 100, 1000 мл, ГОСТ 1770-74;
5. Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74
6. Лампа настільна
7. Дозатор автоматичний поршневий медичний А-2, ТУ 64-1-2828-81
8. Дозатор піпетковий ПІ-0,2, ТУ 64-1-3329-81
9. Секундомір тип СОС пр. – 26-2-00. ТУ 23-1894.003-90
10. Штативи для пробірок поліетиленові ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669-83
11. рН-метр-мілівольтметр, тип рН-150, ГОСТ 22261-82
12. Піпетка скляна мірна градуйована місткістю 1 мл, ГОСТ 20292-74
13. Фільтрувальний папір, ГОСТ 12026-76
14. Водяна баня, ("Bio Mark" Inc, м. Львів, Україна)

РЕАКТИВИ

1. Хлорид кальцію, кваліфікація "ч", ТУ 6-09-4711-81
2. Льодяна оцтова кислота, кваліфікація «чда» ГОСТ 61-75;
3. Хлорид натрію, кваліфікація "ч", ТУ 6-09-3658-74
4. Борнокислий натрій, кваліфікація "чда", ГОСТ 4198-76

РОЗЧИНИ

1. 0,025 М розчин хлориду кальцію (готувати із сухого прожареного хлориду кальцію): в мірну колбу місткістю 100 мл внести наважку 277 мг хлориду кальцію, зваженого з точністю до 0,005 г, додати 99,723 мл дистильованої води. Ретельно перемішати. Зберігати в темному прохолодному місці.

1. 1% розчин оцтової кислоти (рН 5,3): у мірну колбу внести 1 мл оцтової кислоти долити 99 мл дистильованої води і довести рН розчином бури довести, перемішати. Зберігати в темному прохолодному місці.

1. Розчин борнокислого натрію: у мірну колбу місткістю 1000 мл внести борнокислого натрію 9 г, борнокислого натрію 1 г, зважених з точністю до 0,005 г, довести до мітки дистильованою водою, перемішати. Зберігати в прохолодному місці.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

В пробірку внести 0,5 мл плазми і 8 мл дистильованої води, змішати і додати 0,15 мл 1% розчину оцтової кислоти (рН повинна бути 5,3) (можна частину робити суміш дистильованої води з оцтовою кислотою і автоматично розливати дозатором).

Пробірку залишити на 30 хв при температурі +4° С.

Суміш центрифугувати при 1500 об/хв 5 хв.

Вити надосадочну рідину і пробірки перевернути на фільтрувальний шпатель для видалення залишків рідини.

Від еуглобулінів розчинити в 0,5 мл боратного розчину. Поставити пробірку на водяну баню при температурі +37° С.

Через 1 хв додати 0,5 мл хлористого кальцію. Зафіксувати час з'явлення згустку.

Пробірку залишити на водяній бані і час закінчення лізису визначити по зникненню розчиненню згустку.

Нормальні значення: У здорових людей лізис згустку триває 2 - 4 год (до 240 хв).

Література: Андрєєнко Г.В., Люгова Л.В., Немчикова А.Н и др. Источенне тромболіза при длительном стрессе у крыс // Кардиология.-1987.-№ 7.-С. 95-99.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ВІЛЬНОГО ГЕПАРИНУ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Здатність толуїдинового синього зв'язувати вільний гепарин крові. З'явлення в пробу розчину толуїдинового синього замість фізіологічного розчину скорочує тромбіновий час у відповідності до кількісного вмісту вільного гепарину крові.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

Центрифуга ОПН-3 УХЛ 4.2, ТУ 5-375-42-60-76
Термостат ТС-80, ТУ 64-1-1317-80

3. Терези електронні ВЛ Е –134, 2-й клас ГОСТ 104-88;
4. Колби мірні місткістю 100 мл, 1000 мл, ГОСТ 1770-74;
5. Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74
6. Лампа настільна
7. Дозатор піпетковий ПІ-0,2, ТУ 64-1-3329-81
8. Секундомір тип СОС пр. – 26-2-00. ТУ 23-1894.003-90
9. Штативи для пробірок поліетиленові ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669-83
10. Водяна баня, ("Bio Mark" Inc, м. Львів, Україна)

РЕАКТИВИ

1. Тромбін людини, («Bio Mark», м. Львів, Україна)
2. Натрія хлорид, кваліфікація "ч", ТУ 6-09-3658-74
3. Толуїдіновий синій, ТУ 887-53;

РОЗЧИНИ

1. Розчин тромбіну активністю 30 с: розчин тромбіну тестувати по нормальній донорській плазмі. (в центрифужну пробірку внести 0,2 мл досліджуваної плазми і прогріти на водяній бані при температурі 37° С на протязі 1 хв., після чого внести 0,2 мл розчину тромбіну і одночасно ввімкнути секундомір. Відмітити час утворення згустку при періодичному помішуванні)
2. 0,15 М розчин хлориду натрію: у мірну колбу місткістю 100 мл внести наважку 0,9 г натрію хлориду, зважену з точністю до 0,005 г, додати дистильованої води до мітки, перемішати.
3. 0,1% розчин толуїдінового синього: наважку толуїдінового синього 0,1 г, взяту з точністю 0,005 г перенести в мірну колбу місткістю 100 мл, розчинити в дистильованій воді, довести об'єм розчину до мітки, перемішати. Термін зберігання необмежений.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. В центрифужну пробірку внести 0,05 мл 0,15 М розчину хлориду натрію і 0,1 мл досліджуваної плазми. Пробірку помістити на водяну баню при температурі 37° С.
2. Через 30 с додати 0,1 мл тромбіну і відмітити час зсідання плазми.
3. В другу пробірку внести 0,1 мл плазми і 0,05 мл розчину толуїдінового синього. Пробірку помістити на водяну баню при температурі 37° С.
4. Через 30 с додати 0,1 мл тромбіну і відмітити час зсідання плазми. Різниця в часі зсідання плазми в першій і в другій пробірці вказує на час зв'язування вільного гепарину.

Читання результатів: В нормі час зв'язування вільного гепарину крові 5-12 с.

Література: Сирман Э. Новые методы исследования системы свертывания крови // Пробл. гематол. и перелив. крови. -1957, Т.2, № 6, -С.38-44.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ПЛАЗМІНУ, ПЛАЗМІНОГЕНУ І СУМАРНОЇ ФІБРИНОЛІТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

По ступеню гідролізу азофібрину визначають фібринолітичну активність плазми крові до і після активації її стрептокіназою або урокіназою. По фібринолітичній активності (ФА) до активації визначають вміст плазміну, а по різниці між ФА активованої і неактивованої плазми – вміст плазміногену.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Центрифуга ОПН-3 УХЛ 4.2, ТУ 5-375-42-60-76
2. Термостат ТС-80, ТУ 64-1-1317-80
3. Колориметр фотоелектричний концентраційний КФК-2-УХЛ 4.2, ТУ 3-3-1-66-82
4. Вата, ГОСТ 55. 56-81
5. Шприци для ін'єкцій, ("Луер"), ТУ – У 64 - 00480922-25-96
6. Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74
7. Шпатель для пробірок поліетиленові ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669-83
8. Подяна баня, ("Bio Mark" Inc, м. Львів, Україна)
9. Холодильник побутовий, ТУ 84-89

РЕАКТИВИ

У відповідності з набором («Bio Mark», Inc м. Львів, Україна) або з іншими окремими реагентами:

1. Азофібрин - реагент N 1. Порошок від жовто-гарячого до темно-синього кольору.
2. Стрептокіназа або урокіназа - реагент N 2. Ліофільно висушений порошок білого кольору.
3. Концентрований фосфатний буферний розчин (БР) - реагент N 3 - 10 мл.
4. Гідроксид натрію, кваліфікація «хч» ГОСТ 4328-77

РОЗЧИНИ

1. Вміст флакону з реагентом N 1 розважити в 25 сухих пробірок по 10 мг в кожну. Пробірки можна зберігати тривалий час при кімнатній температурі в сухому приміщенні.
2. Приготування робочого розчину активатора: у флакон з активатором плазміногену додати 0,75 мл робочого БР. Декілька разів обережно струсити до повного розчинення сухої речовини (не допускаючи утворення піни). Робочий розчин активатора використовувати тільки свіжим.

3. Підготовка робочого буферного розчину (БР): розвести концентрований БІ (реагент N 3) в 8 разів (співвідношення 1:7) дистильованою водою і старанно перемішати на магнітному перемішувачі. Зберігати при температурі + 4° С.
4. 5 М розчин натрію гідроксиду: наважку натрію гідроксиду 200 г кількісно перенести у мірну колбу місткістю 1 л, розчинити дистильованою водою і довести об'єм до мітки.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. Використовувати свіжу плазму (до 2 годин зберігання) цитратної крові, після центрифугування при 1500 об/хв на протязі 12 хв.
2. Приготувати шприци набиті ватою з товщиною шару близько 0,5 см.
3. В 3 пробірки з азофібрином (дві дослідні і третя контроль) додати: в 1 - 0,85 мл, в 2 - 0,70 мл, а в 3 - 1,00 мл робочого БР.
4. Потім в 1 і 2 пробірки внести по 0,15 мл дослідної плазми крові, після чого в 2 пробірку додати 0,15 мл розчину активатора (реагенту N 2).
5. Пробірки інкубувати на водяній бані при температурі + 37° С протягом 1 години. Під час інкубації вміст пробірок 1 раз в 15-20 хв обережно перемішати за допомогою скляної палички, не допускаючи налипання субстрату на стінки пробірок вище рівня буферу.
6. Після закінчення інкубації в усі пробірки додати по 3,0 мл дистильованої води, інтенсивно перемішати і фільтрувати через тонкий шар вати, яка знаходиться в шприцах, продавлюючи поршнем.
7. До фільтратів додати по 0,02 мл або по 1 краплі 5 М розчину натрію гідроксиду. Після перемішування розвивається інтенсивне забарвлення від оранжевого до червоного.
8. Паралельно для кожної дослідної плазми готувати ще одну контрольну пробу, додаючи до 0,15 мл плазми 3,85 мл дистильованої води і 0,02 мл (або 1 краплю) 5 М розчину натрію гідроксиду.
9. Інтенсивність забарвлення фільтратів проб (оптичну густину розчинів) фотометрувати проти дистильованої води на КФК-2 при довжині хвилі 440 нм (синій світлофільтр) при довжині оптичного шляху 1 см.

Розрахунок результатів проводити по формулам в %:

$$\Phi A = (E1 - E2) \times K1;$$

$$Pn = (E1 - Ek) \times K2;$$

$$Pg = (E2 - E1) \times K3, \text{ де}$$

ΦA - сумарна фібринолітична активність,

Pn - концентрація плазміну,

Pg - концентрація плазміногену,

$E1$ - поглинання в 1 пробірці,

$E2$ - поглинання в 2 пробірці,

Ek - сума поглинання в 3 і 4 пробірках (сума поглинань контролів на азофібрин і плазму),

К1, К2, К3 - коефіцієнти розрахунку виведені для кожної серії наборів при дослідженні пулу плазми 20 здорових донорів:

$E1 = 100: (E2 - E_k)$,

$E2 = 100: (E1 - E_k)$,

$E3 = 100: (E2 - E1)$.

При дослідженні пулу плазми коефіцієнт варіації не перевищує 7%.

Нормальні значення: плазміну - $100 \pm 12\%$,

плазміногену - $100 \pm 18\%$,

ФА - $100 \pm 18\%$.

Література: 1. Андреев Г.В. Фибринолиз.- М., Изд-во МГУ.-1979.- 351 с.

2. Варемеєнко К.Н., Голобородько О.П., Кизим А.И. Протеоліз в нормі і патології.- Киев, Здоров'я.- 1988.- 199 с.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ЕТАНОЛОВОГО ТЕСТУ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Фібрин-мономерні комплекси та ПДФ-комплекси при взаємодії з 50% розчином етанолу переходять з стану золя в гель. Для попередження утворення таких комплексів після забору крові, тобто поза організмом, в стабілізатор додається інгібітор фібринолізу - ϵ -амінокапронова кислота.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Колба мірна місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74;
2. Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74
3. Пампа настільна
4. Дозатор піпетковий П1-0,2, ТУ 64-1-3329-81
5. Секундомір тип СОС пр. - 26-2-00. ТУ 23-1894.003-90
6. Штативи для пробірок поліетиленові ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669-83

РЕАКТИВИ

Етиловий спирт 96°, ГОСТ 5962-67

РОЗЧИНИ

50% розчин етилового спирту: в мірну колбу місткістю 100 мл внести 52 мл етилового спирту та долити до мітки дистильованої води, перемішати.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. В центрифужну пробірку внести 0,4 мл досліджуваної плазми
2. Додати 0,15 мл 50% розчину етилового спирту, змішати.
3. Залишити на 10 хв при кімнатній температурі. Відмітити результат реакції.

Тест вважається позитивним, якщо рівно через 10 хв утворюється желеподібний згусток або поява невеликої зернистості чи помутніння.

Література: Breen F.A., Tullis J.L. Ethanol gelation: a rapid screening test for intravascular coagulation // *Annales of Internal Medicine.* -1968.-V.69, № 6. P. 1197-1206.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ФІБРИНОГЕНУ В (β -нафтоловий тест)

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Спиртовий розчин β -нафтолу осаджує із плазми фібрин-мономери і комплекси з фібринопептидами А і В та фібриногеном, які з'являються з фібриногена під дією тромбіна.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Терези електронні ВЛ Е-134, 2-й клас ГОСТ 104-88
2. Колба мірна місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74
3. Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74
4. Лампа настільна
5. Дозатор піпетковий П1-0,2, ТУ 64-1-3329-81
6. Секундомір тип СОС пр. - 26-2-00. ТУ 23-1894.003-90
7. Штативи для пробірок поліетиленові ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669-83

РЕАКТИВИ

1. β -нафтол, кваліфікація "чда", ГОСТ 5835-79
2. Етиловий спирт 96°, ГОСТ 5962-67

РОЗЧИНИ

1. 50% розчин етилового спирту: в мірну колбу місткістю 100 мл внести 50 мл етилового спирту, долити до мітки дистильованої води.
2. 2% спиртовий розчин β -нафтолу: наважку β -нафтолу 2,0 г, зважену з точністю до 0,005 г, розчинити в 98 мл 50% етилового спирту.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. В центрифужну пробірку внести 1 мл досліджуваної плазми
2. Додати 5 крапель 2% розчину β -нафтолу.
3. Змішати і залишити на 10 хв при кімнатній температурі.
4. Відмітити результат реакції.

Тест вважається позитивним, якщо рівно через 10 хв. утворюється желеподібний згусток чи з'являється невелика зернистість; помутніння є негативним результатом.

**СТАНДАРТНА МЕТОДИКА
ВИЗНАЧЕННЯ РОЗЧИННИХ
ФІБРИН-МОНОМЕРНИХ КОМПЛЕКСІВ (РФМК)
ТА РАННІХ ПРОДУКТІВ ДЕГРАДАЦІЇ
ФІБРИНОГЕНУ (РПДФ)**

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Тест базується на здатності деяких штамів золотистого стафілококу взаємодіяти з РФМК і РПДФ. Така взаємодія враховується візуально по агломинації бактеріальних клітин. Тест є специфічним по відношенню до фібриногену, РФМК і РПДФ та дозволяє визначити їх кількість від 2-5 мкг/мл.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Центрифуга ОПН-3 УХЛ 4.2, ТУ 5-375-42-60-76
2. Термостат ТС-80, ТУ 64-1-1317-80
3. Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74
4. Лампа настільна
5. Пластик для імунологічних реакцій, ТУ 84-2-278-79
6. Дозатор піпетковий П 1-0,2, ТУ 64-1-3329-81
7. Секундомір тип СОС пр. - 26-2-00. ТУ 23-1894.003-90
8. Штативи для пробірок поліетиленові ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669-83
9. Пластик для імунологічних реакцій, ТУ 84-2-278-79
10. Холодильник побутовий, ТУ 84-89

РЕАКТИВИ

Склад набору:

1. Стафілококовий реагент (СР) - реагент N 1. Містить порошок вбитих клітин золотистого стафілококу.
2. Стандартний зразок фібриногену (СЗФ) - реагент N 2.
Містить 1 мл ліофілізованої плазми здорових донорів з концентрацією фібриногену 32 мкг/мл.
3. Цицерин-буферна суміш для отримання суспензії СР, в якій знаходиться металевий стержень з поліетиленовим покриттям для перемішування суміші на магнітній мішалці - реагент N 3.
4. Тромбін людини - реагент N 4. Містить 150 од. НІН тромбіну.
5. 0,15 М розчин хлориду натрію - 10 мл. Реагент N 5.
6. Концентрований буферний розчин - 10 мл. Реагент N 6.

РОЗЧИНИ

1. Приготування суспензії СР: Реагент N1 висипати у флакон з реагентом N3 та перемішати на магнітній мішалці 1 год. Приготована суспензія зберігає свою чутливість до фібриногену та його похідних на протязі 2-3 місяців при температурі + 4-2° С. Перед використанням суспензію повторно перемішати на протязі 5-7 хв.

2. Приготування розчину СЗФ. У флакон з реагентом N2 додати 9 мл дистильованої води та розчинити. Відібрати в скляну пробірку 1 мл отриманого розчину, додати 9 мл робочого буферного розчину (БР, див. п. 3), змішати. Розлити по 0,15-0,20 мл в кожну з 50 одноразових пробірок. Зберігати до використання в морозильній камері при температурі -5-29° С (розчин СЗФ). Розчин СЗФ має концентрацію фібриногену 32 мкг/мл і зберігає свою активність протягом двох місяців.

3. Приготування розчину тромбіну (реагент N4). Вміст флакону розчинити в 5,0 мл 0,15 М розчину хлориду натрію (маточний розчин). Час його зберігання без зниження зсідальної активності - 2 місяці при температурі +4-2° С. Перед використанням, один об'єм маточного розчину розвести двома об'ємами 0,15 М розчину хлориду натрію. Допускається зберігання маточного розчину тромбіну в замороженому стані з 3-4-х кратним заморожуванням-розморожуванням.

4. Приготування робочого БР. Реагент N6 розвести в 10 разів дистильованою водою. Робочий БР зберігає свої властивості на протязі двох місяців при зберіганні при температурі +4-2° С.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

Використовувати сироватку крові.

1. Приготування серії розведень СЗФ: У вісім лунок, починаючи з другої, першого ряду планшету внести по 0,05 мл робочого буферного розчину. Потім в першу лунку додати 0,1 мл СЗФ, відібрати 0,05 мл і перенести в другу лунку, суміш перемішати, відібрати 0,05 мл і перенести в третю лунку. Операції повторюють аж до 9-ої лунки, з якої після перемішування відібрати і відкинути 0,05 мл суміші. Після послідовного розведення і перемішування концентрація фібриногену в лунках наступна:

№ лунки	Розведення	Концентрація фібриногену, мг/мл
1	=1	32
2	1:2	16
3	1:4	8
4	1:8	4
5	1:16	2
6	1:32	1
7	1:64	0,5
8	1:128	0,25
9	1:256	0,125

Приготування серії розведеної сироватки: у вісім лунок, починаючи з другої, другого ряду планшету внести по 0,05 мл робочого буферного розчину. Потім в першу лунку додати 0,1 мл дослідної сироватки, відібрати 0,05 мл і перенести в другу лунку, суміш перемішати, відібрати 0,05 мл і перенести в третю лунку. Операції повторити аж до 9-ої лунки, з метою перемішування відібрати і відкинути 0,05 мл суміші. Після виконання вказаних операцій розведення сироватки у лунках наступні:

№ лунки	Розведення
1	1:2
2	1:4
3	1:8
4	1:16
5	1:32
6	1:64
7	1:128
8	1:256
9	1:512

Визначення чутливості стафілококового реагенту: До кожного із розведень (S) додати по 0,05 мл (або по 1 краплі) суспензії стафілококового реагенту, енергійно перемішати вміст лунок шляхом погойдування планшету протягом 3 хв. У відбитому світлі спостерігати аглютинацію (злипання) стафілококів. Для контролю в одній із лунок змішати буферний розчин і стафілококовий реактив (аглютинація не повинна спостерігатись). Найбільше розведення (S) стандартного розчину фібриногену, в якому все ще спостерігається аглютинація, відповідає чутливості методу, що дорівнює $32/S$ мкг/мл (найчастіше, це трапляється при розведенні в межах 1:16 - 1:64, що відповідає чутливості 0,5-2мкг/мл).

Визначення концентрації РФМК і РПДФ: До кожного із розведень дослідної сироватки додати по 0,05 мл (або по 1 краплі) суспензії стафілококового реагенту, енергійно перемішати вміст лунок шляхом погойдування планшету протягом 3 хв. У відбитому світлі спостерігати аглютинацію (злипання) стафілококів. Найбільше розведення дослідної сироватки (X), в якому все ще спостерігається аглютинація, використовувати для визначення концентрації РФМК і ПДФ, яку розрахувати за рівнянням:

$$X = (32xS)/S,$$

X - концентрація РФМК та ПДФ в дослідній плазмі, мкг/мл;

S - концентрація фібриногену в стандартному зразку, мкг/мл.

X - найбільше розведення дослідної сироватки, для якого ще спостерігається аглютинація, кількість разів.

S - найбільше розведення стандартного зразку фібриногену, для якого ще спостерігається аглютинація, кількість разів.

Читання результатів: Нормальний вміст РФМК і РПДФ в сироватці крові складає 0-4 мкг/мл. Вміст похідних фібриногену зростає при внутрішньосудинному зсіданні крові і активації фібринолізу.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТРОМБІНУ III В ПЛАЗМІ КРОВІ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Розведена цитратна плазма інкубується з стандартною кількістю тромбіну (при цьому частина тромбіну зв'язується з антитромбіном III) після чого по часу зсідання фібриногену визначається залишок активності тромбіну. Чим активніше антитромбін III в досліджуваній плазмі, тим нижча активність тромбіну і тим повільніше зсідається фібриноген, на якому тестується ця активність.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Центрифуга ОПН-3 УХЛ 4.2, ТУ 5-375-42-60-76
2. Термостат ТС-80, ТУ 64-1-1317-80
3. Терези електронні ВЛ Е -134, 2-й клас ГОСТ 104-88;
4. Колба мірна місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74;
5. Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74
6. Лампа настільна
7. Дозатор піпетковий П 1-0,2, ТУ 64-1-3329-81
8. Секундомір тип СОС пр. - 26-2-00. ТУ 23-1894.003-90
9. Штативи для пробірок поліетиленові ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669-83
10. Водяна баня, ("Bio Mark" Inc, м. Львів, Україна)

РЕАКТИВИ

У відповідності з набором («Bio Mark», Inc м. Львів, Україна) або іншими окремими реагентами:

1. Тромбін людини - 2 фл. по 100 од. НІН
2. 0,15 М розчин хлориду натрія - 2 фл. по 10 мл.
3. Фібриноген - 5 фл. по 4 мл
4. Буфер Міхаеліса, рН 7,6 (концентрований) - 1 фл. по 10 мл.

РОЗЧИНИ

1. Підготовка розчину тромбіну: вміст флакону розчинити в 2 мл 0,15 М розчину хлориду натрія. В отриманому маточному розчині активність тромбіну складає 50 од. НІН/мл. Із маточного розчину приготувати робочий розчин тромбіну з активністю 10 од. НІН/мл розчину (тобто маточний розчин змішати з 0,15 М розчином хлориду натрія в співвідношенні 1:4).

Тестування активності тромбіну: 0,2 мл розчину тромбіну внести у пробірку (0,3 мл розчину фібриногену, попередньо прогрітого на протязі 1 хв при температурі 37° С. Одночасно ввімкнути секундомір, пробірку витягти із водяної бані і струсити на темному фоні (або на фоні пучка світла настільної лампи) до утворення згустку (ниток чи пластивців фібрину). Для кожної серії набору свій час утворення згустку, в межах 9-15 хв. Якщо активність тромбіну менша, то до робочого розчину додати 0,1 М розчину хлориду натрія (наприклад, 1:4,5; 1:5 і т.д.); якщо більша додати невелику кількість маточного розчину тромбіну.

Стабільність маточного розчину тромбіну:

при температурі +15 - 25° С - 24 год; при температурі + 2-8° С - 48 год; при температурі - 10-20° С - 2 неділі.

Стабільність робочого розчину тромбіну при температурі + 20° С не більше 10 год.

Підготовка розчину фібриногена: вміст флакону розчинити в 4 мл дистильованої води. Розчин готувати безпосередньо перед використанням.

Стабільність при температурі +20° С - 2 год.

Підготовка робочого буферного розчину: буфер розвести дистильованою водою в 15 разів (1:14).

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. Пробу готувати безпосередньо перед використанням. До 0,1 мл цитратної плазми додати 1,9 мл розведеного буферного розчину. Стабільність розведеної плазми при температурі + 20° С до 4 години.

2. До 0,2 мл робочого розчину тромбіну додати 0,1 мл проби (плазми, що розведена в 20 разів). Суміш інкубувати на протязі 2 хв. (точно !) при температурі + 37° С.

3. Пробірку вийняти з водяної бані, інтенсивно збовтати її декілька разів для релакції згустку, що утворився (згусток вийняти за допомогою голки або проволочки).

4. Швидко відібрати 0,2 мл суміші і додати до 0,3 мл розчину фібриногену (який попередньо прогріти на протязі 1 хв при температурі 37° С) і одночасно ввімкнути секундомір.

5. Пробірку вийняти з водяної бані і стряхуючи її на темному фоні або на фоні світла настільної лампи, зафіксувати час утворення фібринового згустку.

6. По калібровочній кривій знайти відсоток вмісту антитромбіну III.

Примітка: Робочий розчин тромбіну при тестуванні, побудові калібровочної кривої і в процесі визначення не прогрівати. В кожному флаконі розчину фібриногену перед використанням необхідно перевіряти його зсідаючі властивості (див. Тестування тромбіну). Інтенсивність струшування пробірки перед визначення і при побудові калібровочної кривої повинна бути однаковою.

Побудова калібровочної кривої:

Змішану цитратну плазму 10 здорових донорів розвести буфером 1:10, 26,7; 20 і 16 разів, для чого в серію пробірок додати 0,05; 0,075; 0,1 і 0,125 мл плазми і додати об'єм буфером до 2,0 мл по наступній схемі:

Розведення, разів	40	26,7	20	16
Об'єм плазми, мл	0,05	0,075	0,1	0,125
Об'єм робочого буферного розчину, мл	1,95	1,925	1,9	1,875

Розведення в 20 разів відповідає 100% активності антитромбіну III розведення в 40; 26,7 і 16 разів - 50, 75 і 125%, відповідно. В кожному з розведених зразків плазми визначити антитромбінову активність по часі зсідання фібриногену (див. хід визначення). На міліметровому папері побудувати криву розведення, по осі ординат якої відкласти час зсідання в с, а по осі абсцис - активність антитромбіну III в процентах, у відповідності з приготованими розведеннями. Результати визначення антитромбіну III в дослідній плазмі залежать від точності приготування розведень і побудови калібровочної кривої.

Оцінка і читання результатів: Концентрація антитромбіну III знижена при ДВС-синдромі, у людей із захворюваннями печінки і нефротичним синдромом та ін.

В нормі відсоток вмісту антитромбіну III складає 80 - 120%.

Література: 1. Hensen A., Loeliger E.A. Antithrombin III: its metabolism and its function in blood coagulation // Stuttgart, 1963.-160 p. - 2. Лабораторные методы исследования системы гемостаза / Балуда В.П., Баркаган З.С., Гольдберг Е.Д. и др. - Томск, 1980.- 304 с. - 3. Інструкція до набору «Набір для визначення антитромбіну III в плазмі» фірми «Simko LTD» м. Львів.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ШВИДКО- І ПОВІЛЬНОДІЮЧИХ ІНГІБІТОРІВ ПЛАЗМИ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

В основі методу лежить різна здатність антиплазмінів інгібувати уварення плазміну. Швидкодіючі антиплазміни (в основному α_2 -антиплазміни) виявляють свою активність у перші секунди взаємодії з плазміном. Діють повільних антиплазмінів (α_2 -макроглобулін, α_1 -антитрипсин і ін.) виявляється після годинної інкубації плазми з плазміном.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Центрифуга ОПН-3 УХЛ 4.2, ТУ 5-375-42-60-76
2. Термостат ТС-80, ТУ 64-1-1317-80

- 1. Холодильник побутовий, ТУ 84-89
- 2. Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74
- 3. Ляжка настільна
- 4. Автомат піпетковий П 1-0,2, ТУ 64-1-3329-81
- 5. Еквідомір тип СОС пр. – 26-2-00. ТУ 23-1894.003-90
- 6. Шпатель для пробірок поліетиленові ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669-83
- 7. Льодяна баня ("Bio Mark" Inc, м. Львів, Україна)

РЕАКТИВИ

У відповідності з набором («Bio Mark», Inc м. Львів, Україна) або з іншими окремими реагентами:

- 1. Боратний буферний розчин
- 2. Фібриноген
- 3. Натрій
- 4. Тромбін
- 5. Натрія хлорид, кваліфікація "ч", ТУ 6-09-3658-74

РОЗЧИНИ

- 1. Боратний боратний буферний розчин: вміст флакону з боратним буферним розчином розчинити дистильованою водою до кінцевого об'єму 40 мл. Зберігати при температурі +4° С.
- 2. Робочий розчин фібриногену: вміст флакону з фібриногеном розчинити дистильованою водою. Використовувати свіжевикотвореним.
- 3. Розчин тромбіну: вміст флакону з тромбіном розчинити в 5 мл 0,15 М розчину хлориду натрію. Зберігати при температурі +4° С. Стабільність розчину при температурі +20° С не більше 10 годин.
- 4. Розчин плазміну: вміст флакону з плазміном розчинити в 10 мл 0,15 М розчину хлориду натрію. Розлити у флакони та заморозити при температурі -18° С. Перед використанням розвести розчин у 3-6 разів.

Тестування активності плазміну: у пробірку внести 0,2 мл розчину фібриногену, 0,2 мл боратного буферу, 0,2 мл плазміну та 0,1 мл тромбіну. Визначити час повного лізису утвореного згустку при температурі 37° С. Якщо час лізису менше 8 хв, необхідно додатково розвести розчин плазміну, якщо більше 12 хв. – розчин плазміну непридатний для використання.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

- 1. Для звільнення плазми від фібриногена необхідно прогріти її при температурі 56° С впродовж 3 хв. Після чого помістити в льодяну баню для охолодження і центрифугувати 10 хв при 2000 об/хв. Супернатант використати для дослідження.
- 2. Визначення швидкодіючих антиплазмінів: до 0,2 мл плазми, що досліджується, розведеної в 5-10 разів боратним буферним розчином, додати

0,2 мл розчину плазміну і відразу внести 0,2 мл робочого розчину фібриногену та 0,1 мл тромбіну. Пробірку помістити в водяну баню при температурі 37°C. Після швидкого утворення згустку (20-40 с) відмітити час повного лізису.

3. Визначення повільнодіючих антиплазмінів: до 0,2 мл плазми, що досліджується, розведеної в 5-10 разів боратним буферним розчином додати 0,2 мл розчину плазміну та інкубувати впродовж 1 години при 37°C. Потім додати 0,2 мл робочого розчину фібриногену та 0,1 мл тромбіну. Після утворення згустку відмітити час повного лізису.

Отримане значення часу лізису згустку характеризує сумарний рівень антиплазмінів - швидко- і повільнодіючих. Для розрахунку рівня повільнодіючих антиплазмінів з отриманого значення часу лізису відняти час лізису згустку, що характеризує вміст швидкодіючих антиплазмінів для тієї ж плазми.

Рівень антиплазмінів (швидко- і повільнодіючих) крові хворого розраховується в % від рівня антиплазмінів здорової людини прийнятого за 100%. Наприклад, час лізису згустку плазми здорової людини (пул плазми донорів) дорівнює 30 хв (без попередньої інкубації плазми з плазміном) і 55 хв (з попередньою інкубацією 1 година), а у випадку дослідження плазми хворого, відповідно 38 і 72 хв. Тоді рівень швидкодіючих антиплазмінів у плазмі хворого буде дорівнювати $38 \times 100/30 = 126,6\%$, а повільнодіючих - $(72-38) \times 100/(55-30) = 136\%$.

Література: 1. Андрєенко Г.В., Карабасова М.А., Лютова Л.В. и др. Методы исследования фибринолитической системы крови // Изд-во МГУ.- 1981.-С. 77-79. - 2. Пасторова В.Е., Ковалев С.В. Влияние антитромбина III на функцию противосвертывающей системы у жив отных при внутривенной инъекции тканевого тромбoplastина. // Вопросы мед. химии.-1976.-№2.-С. 240-245. - 3. Niewiarowski S. L'adsorbition des facteurs du system fibrinolytique par la bentonite // Pathologie et Biologie.-1959.-Vol.7.-P. 2557.

РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ПРОВЕДЕННЯ ІМУНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ ПОВЕРХНЕВИХ АНТИГЕНІВ КЛІТИН ЗА ДОПОМОГОЮ НЕПРЯМОЇ ІМУНОФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ. (Дослідження субпопуляції лімфоцитів)

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Метод оснований на специфічності імунологічної реакції та чутливості флуоресцентної мікроскопії. Специфічні антитіла зв'язуються з антигенами поверхневих клітин, що знаходяться в суспензії. Для виявлення цього комплексу потрібні другі антитіла, мічені флюорохромом. Таким чином маркування клітин проходить в два етапи. Другі антитіла сприяють виявленню зв'язаних з клітиною перших антитіл, бо вони мають забарвлення.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Дозатор піпетковий ПІ-0,02, ПІ-0,2, ПІ-1,0, ТУ 64-1-3329-81
2. Горези електронні ВЛ Е-134, ГОСТ 24104-88
3. Секундомір, тип СОС пр-26-2-000, ТУ 23-1894.003-90
4. Камера Горяєва
5. Колба мірна місткістю 100, 1000 мл, ГОСТ 10394-72
6. Класичний лічильник для підрахунку формених елементів крові, (ЗМА, Київ)
7. Мембрани для стерилізації з порами діаметром 0,2 мкм, (Millipor, Whatman, Gelman, Pall)
8. Мікроскоп бінокулярний "Биолам Р11", (Ломо, Росія)
9. Мікроскоп бінокулярний люмінесцентний "Люмам - Р8" (Ломо, Росія)
10. Освітлювач для мікроскопу ОИ-8 (Ломо, Росія)
11. Піпетка скляна місткістю 2, 5 мл, ГОСТ 20292-74
12. Піпетка Пастера
13. Предметне скельце, ГОСТ 9289-59
14. Покровні скельця, ГОСТ 6672-59
15. Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74
16. Смуга Parafilm M, American Can Company, США
17. Стакан хімічний місткістю 1000 мл, ГОСТ 10394-72
18. Термостат ТС-80 М-2, ТУ 64-1-1382-83
19. Центрифуга ОПн-3 УХЛА, 2, ТУ 5.375-4260-76
20. Циліндри мірні місткістю 100, 250, 1000 мл, ГОСТ 1770-74

21. Чашки Петрі, ТУ 64-2-19-7822.
22. Холодильник побутовий, ТУ 27-56-982-83
23. рН метр – мілівольтметр, тип рН 150, ГОСТ 22261-8-82
24. Плитка електрична з зак. сп. тип ЕПШ -1- 0.8, ГОСТ 14919 - 836

РЕАКТИВИ

1. Натрію хлорид, кваліфікація «чда», ГОСТ 4233-77
2. Калію дигідрофосфат, кваліфікація «чда», ГОСТ 4198-75
3. Натрію гідрофосфат зневоднений, кваліфікація «чда», ГОСТ 4172-77
4. Амонію хлорид, кваліфікація «чда», ГОСТ 3773-72
5. Кислота соляна концентрована, кваліфікація «ч», ГОСТ 3118-77
6. Масло імерсійне нефлюорисцируюче, («Merck», Німеччина)
7. Тріомбразт (verografin) 76%
8. Фікол 400, кваліфікація «чда», («Sigma», США)
9. Трис основний (оксиметил) амінометан, кваліфікація «чда» («Merck» Німеччина)
10. Трипановий синій, («Sigma», США)
11. Моноклональні антитіла - (МКАТ) - LT3, LT4, LT8, LT16, LT20 (ТОО «Сорбент», Москва, Росія)
12. Анти-F(ab), FITC-кон'юговані козячі антитіла до мишачих імуноглобулінів (ТОО «Сорбент», Москва, Росія)
13. Полі-L-лізін м.м. 40-80 кД, («Sigma», США)
14. Парафін, ТУ 6-09-3637-89 (для лабораторних завдань)
15. Кислота соляна, кваліфікація «ч», ГОСТ 3118-77

РОЗЧИНИ

1. Приготування забуференого фізіологічного розчину (ЗФР) рН 7,2: наважки хлориду натрію 8,015 г, дигідрофосфату калію 0,41 г, гідрофосфату натрію зневодненого 1,78 г, зважених з точністю 0,005 г, розчинити в дистильованій воді в мірній колбі місткістю 1000 мл, долити дистильовану воду до об'єму приблизно 950 мл, ретельно перемішати, перевірити рН. При необхідності довести рН 0,1 М соляною кислотою до рН 7,2 та долити воду до мітки.
2. Приготування лізуючого розчину (рН 7,2): Змішати 9 об'ємів розчину А з одним об'ємом розчину Б.
3. Приготування розчину А - 0,83% амонію хлориду: наважку амонію хлориду 8,3 г, зваженого з точністю до 0,005г, розчинити в дистильованій воді в мірній колбі місткістю 1000 мл (налити дистильовану воду до об'єму приблизно 950 мл, ретельно перемішати), та долити дистильованою водою до мітки, ще раз перемішати.
4. Приготування розчину Б: 2,06% розчин трису: наважку трису 2,06 г, зваженого з точністю до 0,005 г, розчинити в дистильованій воді в мірній

до 100 мл (долити воду приблизно до об'єму 90 мл та довести до 7,65 мл допомогою 0,1 М соляної кислоти).

Приготування градієнту густини 1,075 г/л. Фікол-верографін (змішати 34% тріомбразу густини 1,075 г/мл та 24 об'єми 9% фіколу):

Приготування 9% розчину фіколу. Наважку фіколу 9 г, зваженого з точністю 0,005 г, розчинити в 91 мл дистильованої води.

Приготувати рідину верографіну. Одну ампулу (20 мл 76% верографіну) розчинити в 24,7 мл дистильованої води (для одержання кінцевої концентрації даного розчину – 34%). Відміряти мірним циліндром 40 мл верографіну перенести в колбу і додати туди 96 мл фіколу.

Приготування 0,2% розчину фарбника трипанового синього

До 100 мл забуференого фізіологічного розчину додати 0,0065 г азиду трипанового, зваженого з точністю 0,0005 г, перемішати до повного розчинення та додати 0,2 г трипанового синього, зваженого з точністю 0,005 г. Розчинити при тривалому перемішуванні. Перед застосуванням розчин центрифугувати для видалення агрегатів фарбника. Розчин не стерилізувати.

Приготування розчину полі-L-лізіну (100 мкг/мл). До 10 мл забуференого фізіологічного розчину додати 1 мг полі-L-лізіну, зваженого з точністю до 0,0005 г, перемішати. Розчиняти при тривалому перемішуванні.

Приготування розчинів моноклональних антитіл за інструкцією, яка надається до антитіл.

Приготування робочого розчину FITC-кон'югованих козячих антитіл до мишиних імуноглобулінів. За допомогою дозатора відміряти 198 мкл ІФР і додати 2 мкл FITC-кон'югованих козячих антитіл до мишиних імуноглобулінів. Розмішати барботуванням.

Соляна кислота 0,1 н (готувати із стандарт-титрів): В мірну колбу об'ємом 1000 мл перенести вміст ампули стандарт-титра соляної кислоти (0,1 н). Ампулу добре промити дистильованою водою, збираючи промивні води в мірну колбу. Вміст колби перемішати, долити розчин дистильованою водою до мітки на колбі та ще раз добре перемішати. Розчин стійкий, зберігати у склянці з притертою пробкою при кімнатній температурі.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. Приготування лейкоконцентрату з цільної крові.

До 1 мл венозної гепаринізованої (25 ОД/мл) крові додати 1 мл забуференого фізіологічного розчину (ЗФР), акуратно перемішати. В пробірку внести 1 мл градієнту щільності, на нього нашарувати 2 мл підготовленої крові.

Центрифугувати 30 хв при 1500 об/хв.

Відібрати дозатором піпетковим верхній шар та вилити.

В центрифужну пробірку зібрати лейкоконцентрат, додати до мітки 5 мл ЗФР, центрифугувати 5 хв при 1500 об/хв.

Надосад повністю злити, пробірку залишити в штативі на 1-2 хв. Клітини ресуспендувати зтрушуванням, ще раз відмити за попередніми вказівками.

При умові присутності еритроцитів провести їх руйнацію лізуючим розчином. Для чого до осаду додати 1 мл лізуючого розчину, ресуспендувати та залишити на 40 сек, потім додати 5 мл ЗФР, центрифугувати 10 хв при 1500 об/хв.

Надосад злити повністю. Провести підрахунок кількості клітин в осаді та довести концентрацію до $3-4 \times 10^6$ /мл. Відмити клітини використовувати для проведення методики.

Підрахунок клітин в осаді: Підрахувати кількість клітин в 1 мл суспензії. У пробірку внести 10 мкл суспензії, долити до неї 10 мкл розчину трипанового синього. Підготувати камеру Горяєва Протерти камеру з сіткою і покривне скло бяззю так щоб вони були сухі. Після чого, притерти скло до камери, легко надавлюючи його. Заповнити камеру попередньо приготованою суспензією, яку треба ретельно перемішати. Скляну паличку занурити в суміш і піднести до краю покривного скельця, слідкуючи за тим, щоб суспензія без бульок повітря заповнила поверхню сітки та не затікала в борідки. Заповнену камеру залишити в горизонтальному положенні на 1 хв для осідання клітин. Не змінюючи горизонтального положення камери, розмістити її на столику мікроскопу і підрахувати число живих, незабарвлених клітин в ста великих квадратах (а).

Розрахунок числа живих клітин в одному мл суспензії проводити виходячи із розведення суспензії (2), числа квадратів (100) та об'єму одного великого квадрату ($1/250000$ мл, оскільки сторона квадрата $1/50$ см, висота його $1/100$ см):

$$X = 50000a$$

де X – число живих клітин в 1 мл суспензії; а – число живих клітин в 100 великих квадратах.

Після цього концентрацію клітин довести до 4×10^6 /мл забуференим фізіологічним розчином. Об'єм забуференого фізіологічного розчину (V_0 , ml), який необхідно додати до V_0 мл отриманої суспензії, розрахувати за формулою $V = V_0(X/4 \times 10^7 - 1)$

За допомогою дозатора відміряти потрібну кількість забуференого фізіологічного розчину, долити в посуду, в якій міститься суспензія клітин об'ємом V_0 , та добре перемішати барботуванням.

Смугу з Parafilm M з потрібною кількістю отворів діаметром 5 мм розмістити на предметному склі і нагріти.

Після прикріплення, в лунки внести по 10 мкл розчину полі-L-лізіна і інкубувати при 37°C 40 хв. Інкубацію проводити в вологій камері.

По закінченні інкубації стекла промити у розчині ЗФР 2 – 4 сек. 3 рази.

2. Приготування цитопрепарату.

Внести лейкоконцентрат в отвори в кількості 10 мкл.

Інкубувати 40 хв при 37°C , стекла промити у розчині ЗФР 2 – 4 сек 3 рази.

Повити по 10 мкл перших антитіл і проводити інкубацію при 37°С протягом 30 хв., після чого скельця знову промити у 3-х порціях ЗФР.

Наступним етапом є інкубація клітин з 10 мкл других антитіл при 37°С протягом 20 хв при 4°С. Провести відмивання (див. попередній пункт), а також витерти, маркером відмітити розташування отворів скельц.

Повити смугу Parafilm M і нанести 10 мкл 50 % розчину гліцерину, приготуваного на 3,7% розчину параформальдегіду.

І. Підрахунок

Препарат накрити покривними скельцями і запаяти парафіном. Підрахунок позитивних клітин проводити за допомогою флуоресцентного мікроскопу на 100 клітин.

Нормальні значення здорових людей (%):

CD3 – 72 ± 7

CD4 – 39 ± 5

CD8 – 24 ± 4

CD16 – 12 ± 6

CD20 – 9 ± 6

Література: Иммунологические методы / Под ред. Г. Фримеля М: Медицина. - 1987. - С.128.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА

ВИЗНАЧЕННЯ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ КЛАСІВ А, G, M МЕТОДОМ РАДІАЛЬНОЇ ДИФУЗІЇ В ГЕЛІ ПО МАНЧІНІ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Метод оснований на вимірюванні діаметру кільця преципітації, яке створюється в результаті взаємодії антигену (імуноглобуліни досліджуваної сироватки) та антитіла (стандартні моноспецифічні сироватки проти імуноглобулінів людини класів А, М, G) при внесенні досліджуваної сироватки в лунки, вирізані в товщі агару, в якому попередньо розчинена моноспецифічна антисироватка. В стандартних умовах дослідження діаметр кільця преципітації прямо пропорційний концентрації імуноглобуліну, що досліджується. Вміст імуноглобулінів визначають відносно стандартної сироватки крові людини з відомою концентрацією імуноглобулінів.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Дозатор піпетковий П1-0,02, ТУ64-1-3329-81
2. Мікроскоп стереоскопічний МБС-9, ТУ 3-3.1210-78
3. Терези електронні ВЛ Е-134, ГОСТ 24104-88
4. Волога камера

5. Зажими дерев'яні
6. Водяна баня
7. Колба плоскодонна термостійка місткістю 200 мл, ГОСТ 1770-74
8. Мікрокалькулятор МК 61
9. Пілетка скляна градуйована місткістю 10 мл, 2-й клас, ГОСТ 20292-74
10. Пробірка центрифужна градуйована, ГОСТ 1770-74
11. Пробірка хімічна, ГОСТ 9289-59
12. Пробійник - металева голка в діаметрі 2 мм, загострена знизу
13. П-подібна латунна пластина, товщиною 1 мм - спейсер
14. Стекла розміром 9x12
15. Термостат ТС-80, ТУ-42-1382-63
16. Циліндр мірний місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74.

РЕАКТИВИ

1. Агар Дифко, Vastoaagar D («Type Usa» Ferak Berlin)
2. Натрію хлорид, кваліфікація «чда», ГОСТ 4233-77
3. Набір моноспецифічних сироваток проти імуноглобулінів людини. Н. (Новгород, Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии).

РОЗЧИНИ

1. Агар 2,5% концентрації на 0,15 М розчині хлориду натрію: наважку агару 2,5 г зважену з точністю 0,005 г перенести в мірну хімічну колбу місткістю 200 мл, додати 100 мл 0,15 М розчину хлориду натрію. Поставити в термостат на 30 хв при 37° С для набухання. Занурити колбу в киплячу водяну баню до просвітлення розчину. Готовий агар розлити в центрифужні пробірки по 7 мл. Зберігати в холодильнику при температурі 4-10° С протягом 14 діб.
2. 0,15 М розчин хлориду натрію: наважку хлориду натрію 8,78 г зважену з точністю до 0,005 г розчинити в дистильованій воді в мірній колбі місткістю 1000 мл. Долити дистильовану воду до об'єму приблизно 950 мл, ретельно перемішати, долити водою до мітки і ще раз перемішати. Термін зберігання 1 доба.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. Розчинити сироватки за інструкцією, яка додається до набору.
2. Приготувати камеру для заливання агару. Для цього між двома скляними пластинами помістити спейсер, закріпити зажимами по периметру.
3. Камеру підігріти до температури 57° С.
4. В хімічну пробірку внести 6 мл фізіологічного розчину, нагрітого на водяній бані до 56° С, до нього додати 1 мл розведеної антисироватки одного

1. Імуноглобулінів і з'єднати з 7 мл агару, охолодженого (або нагрітого) до 36°C. Старанно і швидко розмішати до однорідної маси.

2. Аккуратно залити в камеру.

3. На камеру нанести помітку відповідного класу імуноглобулінів.

4. Процедуру повторити для всіх класів імуноглобулінів.

5. Камери поставити для застигання агару при кімнатній температурі.

6. Після застигання суміші агару з антисироваткою зняти зажими, акуратно зняти одне скло.

7. Палиці застиглого агару пробійником зробити лунки на відстані 1 см від краю пластини та між лунками.

8. В лунку дозатором внести 2 мкл стандартної сироватки, а в решту - сироватки дослідних зразків.

9. Операцію повторити для кожного класу імуноглобулінів.

10. Пластини для виявлення імуноглобулінів А, G поставити на 24 години у вологу камеру.

11. Пластину для виявлення імуноглобулінів класу М поставити у вологу камеру на 48 годин.

12. Після інкубації виміряти діаметр кілець преципітації з точністю до 0,1 мм за допомогою мікроскопу МБС 9.

13. Розрахунок результатів проводити на мікрокалькуляторі «МК-61».

14. Програма для обрахунку концентрацій імуноглобулінів в сироватці за відомою концентрацією стандартної сироватки:

Р.Ш1

00 - $\Pi > x, 1$

01 - F, x^2

02 - $\Pi > x, 3$

03 - F, x^2

04 - (-)

05 - $\Pi > x, x^2$

06 - (-)

07 - $x > \Pi, 4$

08 - c/x

09 - c/Π

10 - F, x^2

11 - $\Pi > x, 3$

12 - F, x^2

13 - (-)

14 - $\Pi > x, 4$

15 - (-)

16 - БП

17 - 0,9

якщо набір зроблено вірно висвітлиться 09 - 51 - 13 - 18

1. - F, авт
2. - Ø кільця преципітації стандарту, $x > П, 1$
3. концентрація стандарту, $x > П, 2$
4. Ø стандартної лунки 2,2, $x > П, 3$
5. В/о
6. с/п
7. Контрольний набір: Ø кільця преципітації стандарту, с/п, повинно висвітлитися числове значення концентрації стандарту.

Нормальні значення: Ig A 3,35 – 4,5 г/л;
 Ig G 4,5 – 21 г/л;
 Ig M 0,35 – 3,1 г/л;

Література: Иммунологические методы / Под ред. Г.Фримеля.-М.: Медицина, 1987.-472с.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ СЕКРЕТОРНОГО ІМУНОГЛОБУЛІНУ А ЛЮДИНИ МЕТОДОМ ІМУНОДИФУЗІЇ В ГЕЛІ ПО МАНЧІНІ ПРИНЦИП МЕТОДУ

Метод оснований на вимірюванні діаметру кільця преципітації, яке утворюється при внесенні дослідного матеріалу (слина, сеча, промивні води бронхів), який містить секреторний імуноглобулін А (Ig A), в лунки, які вирізані в товщі агару, в якому попередньо розчинена моноспецифічна антисироватка. В стандартних умовах досліді діаметр кільця преципітації прямо пропорційний концентрації дослідного секреторного імуноглобуліну. Вміст його визначається відносно стандартної сироватки з відомою концентрацією секреторного Ig A.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Дозатор піпетковий ПІ-0,02, ПІ-0,2, ПІ-1,0, ТУ64-1-3329-81
2. Колба мірна місткістю 100, 1000 мл, ГОСТ 10394-72
3. Пробірки центрифужні 10 мл, ГОСТ 1770-74
4. рН-метр-мілівольметр, тип рН-150, ГОСТ 22261-82
5. Пробійник діаметром 2 мм
6. Волога камера
7. Термометр водяний, ГОСТ 2823-73 ТТ
8. Плитка електрична з зак. сп. тип ЕПШ-1-0,8, ГОСТ 14919-836
9. Водяна баня
10. Циліндр мірний місткістю 100, 1000 мл, ГОСТ 1770-74
11. Пробірка хімічна, ГОСТ 25336-82
12. Колба плоскодонна місткістю 200 мл, ГОСТ 1770-74
13. Стекла розміром 9x12

14. П-подібна латунна пластина, товщиною 1 мм - спейсер
15. Зажими дерев'яні
16. Мікроскоп стереоскопічний МБС-9, ТУ 3-3.1210-78
17. Термостат ТС-80, ТУ-42-1382-63

РЕАКТИВИ

1. Хлорид натрію, кваліфікація «чда» ТУ 6-09-3658-74
2. Набір моноспецифічної сироватки для визначення секреторного муноглобуліну А (Н. Новгород, Росія)
3. Веронал ("Борщагівський хімфармзавод", Україна)
4. Медінал ("Борщагівський хімфармзавод", Україна)
5. Агар Дифко Bactoagar D («Type Usa» Ferak Berlin)

РОЗЧИНИ

1. Веронал-медіналовий буфер, рН 8,6: наважку вероналу 1,38 г зважену з точністю 0,005 г розчинити в дистильованій воді в мірній колбі місткістю 100 мл, долити дистильовану воду до об'єму приблизно 95 мл, ретельно перемішати, розчинити на киплячій водяній бані, не допускаючи кипіння розчину долити воду до мітки. Наважку медіналу 8,76 г зважену з точністю 0,005 г розчинити в дистильованій воді в мірній колбі місткістю 100 мл, долити дистильовану воду до об'єму приблизно 95 мл, ретельно перемішати, долити воду до мітки. Змішати два розчини, додати дистильованої води, охолодити. Перевірити рН розчину. Довести дистильованою водою розчин до об'єму 1 літр.
2. Агар Дифко 1,25 % концентрації. Наважку агару 1,25 г зважену з точністю 0,005 г внести в 100 мл веронал-медіналового буферу, поставити в термостат при 37°С для набухання на 2 години. Тримати на водяній бані до повного просвітлення розчину. Гарячим розлити по 11 мл в пробірки. Використовувати на протязі 1 місяця, зберігаючи в холодильнику.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. Приготувати сироватки по інструкції, яка додається до набору.
2. Розвести стандартну сироватку 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 для побудови калібрувальної кривої.
3. Розморозити дослідний матеріал.
4. Підготувати стекла до заливки. Взяти дві скляні пластини, між ними скласти спейсер. По периметру закріпити два скла зі спейсером лейкопластиром. Лейкопластир повинен рівномірно прилягати до скла. По кутках закріпити зажимами. Поставити в потік теплого повітря.
5. Агар охолодити чи нагріти на водяній бані до 56°С і в нього влити 2 мл сироватки, приготованої як описано вище, нагрітої до 56°С на водяній бані. Старанно розмішати суміш інтенсивним перевертанням пробірки.

6. В простір між пластинами акуратно залити 13 мл суміші антисироватки на агаром. Залишити пластину при кімнатній температурі до застигання агару.
7. Після застигання суміші зажими зняти, акуратно видалити лейкопластир, прибрати одне скло і спейсер, а в товщі агару пробійником зробити лунок на відстані 15 мм одна від одної.
8. В лунки дозатором внести стандарт сироватку у відповідних розведеннях 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 і дослідні секрети.
9. Пластину інкубувати у вологій камері на протязі 48 годин.
10. Після інкубації вимірити діаметр кільця преципітації з точністю до 0,1 мм бінокулярною лупою.
11. На міліметровому папері побудувати калібрувальну криву відкладаючи на осі ординат діаметр кільця преципітації в мм, отримані різними розведеннями стандарту, на осі абсцис відповідні цим кільцям концентрації стандарту секреторного імуноглобуліну А в мг/мл. Так криву отримують в кожному досліді, для кожної пластини.

Нормальні значення: 30-150 мг/л.

Література: Иммунологические методы / Под ред. Г.Фримеля.-М. Медицина, 1987.-472с.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА І МУНОФЕРМЕНТНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Імуноглобуліни є продуктами секреції В-лімфоцитів на кінцевій стадії їх диференціювання, тобто плазматичних клітин і характеризують рівень гуморального імунітету.

Метод заснований на виявленні в сироватці крові імуноглобулінів А, М, G з допомогою специфічних антиглобулінових кон'югатів (анти-Ig А, анти-Ig М, анти-Ig G). Компоненти, що не зв'язалися, відмиваються, а активність ферменту в складі імунних комплексів визначають з допомогою субстрат-хромогенної суміші. Інтенсивність забарвлення хромогену зворотно пропорційна концентрації імуноглобулінів в зразку.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Аналізатор імуноферментний ИФА М/340
2. Термостат ТС-80 М ТУ 64-1-1382-83
3. Колба мірна місткістю 200 мл, ГОСТ 1770-74
4. Лійка скляна, ГОСТ 1770-74
5. Дозатори піпеточні 2-20, П1-100, ТУ 64-1-3329-81
6. Секундомір, тип СОС, пр-26-2-000, ТУ 23-1894.003-90
7. Пробірки центрифужні, ГОСТ 1170-74

7. Шпатель для пробірок, ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669-83
8. Детектор А-2 автоматичний поршневий медичний, ТУ 64-1-2828-81
10. Апарат для стряхування АВУ-6с
11. Фенілтривальний папір, ГОСТ 12026-76

РЕАКТИВИ

Тест-система імуноферментна для визначення вмісту імуноглобулінів А, М, G сироватки крові, (НВЛ «Гранум», м. Харків), ТУ 24.6-31557962-002-2002.

У відповідності з набором:

1. Плашкет полістироловий з імобілізованим антигеном (1-4 стрипи Ig A,
- 5-8 стрипи Ig M, 9-12 стрипи Ig G) - 1
2. Стандартний зразок - 1 уп.
3. Буфер фосфатно-сольовий з твіном-20 (ФСБ)х10-кратний - 1 фл.
4. Цитратно-фосфатний буфер (ЦФБ) - 1 фл.
5. Розчин субстрату (ТМБ-розчин) - 1 фл.
6. Кон'югати (анти- Ig A, анти-Ig M, анти-Ig G), мічені пероксидазою - 1 шт.
7. Розчин для зупинки реакції

РОЗЧИНИ

1. Підготовка розчину ФСБ: в мірну колбу місткістю 200 мл перенести 20 мл ФСБ, довести дистильованою водою до мітки, ретельно перемішати. При появі осаду в концентраті, необхідно його прогріти на водяній бані при температурі 30-40° С до повного розчинення. Приготовлений розчин використовувати для розведення сироваток, кон'югату та промивання плашкети. Термін зберігання розчину - 7 діб при +4°С.

2. Приготування субстратної суміші: у випадку використання повного плашкету (14 проб) у чисту скляну місткістю перенести 9 мл дистильованої води, додати 1 мл концентрованого ЦФБ і 1 мл ТМБ-розчину. При постановці реакції тільки на частині планшету загальний об'єм субстратної суміші розрахувати за формулою: $(N+1) \times 100$ мкл, де N – кількість проб. Кількість концентрованого ЦФБ і 1 мл ТМБ-розчину розрахувати пропорційно.

3. Підготовка стандартного зразку: 5 мкл стандарту розвести в 1 мл ФСБ.

4. Підготовка досліджуваних зразків: перед дослідженням у маркіровані центрифужні пробірки, які знаходяться в штативі, внести 1 мл ФСБ, додати сироватки по 5 мкл, перемішати.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. Перед постановкою дослідження набір витримати при кімнатній температурі протягом 30 хв. В лунки стрипів внести відповідно по 100 мкл розчину ФСБ, стандартного та досліджуваних зразків в 2-х повторях.

структурія на спектрофотометрі при довжині хвилі 280 нм. Низькі концентрації ПЕГ осаджують комплекси великих розмірів. Високі концентрації викликають преципітацію низькомолекулярних сполук.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Дозатор піпетковий ПІ-1,0, ПІ-0,2, ПІ-0,02, ТУ64-1-3329-81
2. Спектрофотометр СФ - 46, ТУ 3-3.1841-84, (Ломо, Росія)
3. Терми електронні ВЛЕ - 134, ГОСТ 24104-88
4. Колба мірна місткістю 100, 1000 мл, ГОСТ 10394-72
5. Пробірки центрифужні 10 мл, ГОСТ 1770-74
6. Термостат ТС-80М-2, ТУ 64-1-1382-83
7. Циліндри мірні місткістю 100, 250, 1000 мл, ГОСТ 1770-74
8. рН-метр-мілівольтметр, тип рН-150 ГОСТ 22261-81-82

РЕАКТИВИ

1. Полістиленгліколь мол. мас. 6000 (ПЕГ), (Loba Feinchemie)
2. Натрію тетраборат, кваліфікація «чда», ГОСТ 6-09-3970-75
3. Борна кислота, кваліфікація «чда», ГОСТ 96-56-75

РОЗЧИНИ

1. Приготування 1,24% розчину борної кислоти: наважку борної кислоти 1,24 г зваженої з точністю 0,005 г розчинити в дистильованій воді в мірній колбі місткістю 100 мл.
2. 1,9% розчин тетраборату натрію: наважку тетраборату натрію 1,9 г зважену з точністю 0,005 г розчинити в дистильованій воді в мірній колбі місткістю 100 мл.
3. Приготування боратного буферу (рН 8,6): в колбу місткістю 100 мл внести 55 мл 1,24% розчину борної кислоти і 45 мл 1,9% розчину тетраборату натрію. Перемішати, перевірити рН. При необхідності внести рН до 8,6.
4. Приготування 3,5% розчину ПЕГ: 3,5 г ПЕГ, зваженого на електронних терезках з точністю до 0,005 г розчинити в дистильованій воді в мірній колбі місткістю 100 мл.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. Пробірки промаркеровані розмістити 3-х рядно в штативі: 1 ряд - приготування сироватки; 2 ряд - контроль; 3 ряд - визначенні імунних комплексів.
2. В перший ряд пробірок внести 0,2 мл дослідної сироватки та додати буферний буфер (в співвідношенні 1:2) - 0,4 мл.
3. В другий ряд - контроль, за допомогою дозатора внести 3,8 мл боратного буфера і 0,2 мл приготовленої сироватки.

4. В третій ряд - внести 3,8 мл ПЕГ і 0,2 мл сироватки (з першого ряду).
5. Інкубувати при кімнатній температурі протягом однієї години.
6. По закінченні інкубації визначити оптичну густину за допомогою спектрофотометра при довжині хвилі 280 нм проти контролю (пробірки з другого ряду).

Нормальні значення: < 100 Од. опт. щ.

Література: Забриски Дж. Б. / Клиническая иммунология сердца. - Москва.- Медицина.- 1984г.- 194с.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ РЕАКЦІЇ БЛАСТТРАНСФОРМАЦІЇ ПРИНЦИП МЕТОДУ

Контакт лімфоцитів, які несуть відповідні рецептори з антигеном або митогеном, визиває реакцію бласттрансформації. Активація лімфоцитів *in vitro* ФГА сприяє їх перетворюванню в недиференційовані зародкові клітини, типу бластів. Процес перетворювання лімфоцитів на неприродному поживному середовищі в різні проміжні форми отримав назву реакції бласттрансформації – РБТЛ. Вона дає можливість оцінювати клітинний імунітет *in vitro*.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Терези торсіонні, ВТ- 500, ТУ 64-1-990-81
2. Дозатор піпетковий П1-1,0, П1-0,2, П1-0,02, ТУ64-1-3329-81
3. Мікроскоп біокулярний Биолам Р11, (Ломо, Росія). Об'єктив 90х, окуляр 7х
4. Планшет імунологічний 96-лунковий, ТУ 64-2-278-79
5. Термостат ТС-80М-2, ТУ 64-1-1382-83
6. Центрифуга ОПН-3, ТУ5375-4260-76
7. Камера Горяєва
8. Піпетка Пастера
9. Пробірки центрифужні мірні, ГОСТ 1770-74
10. Циліндри мірні місткістю 100, 250, 1000 мл, ГОСТ 1770-74
11. Бокс ІБП 1-ос, ІЗ. 420.10, ТУ 95.7217-77
12. Середовище 199 (Державний експериментальний завод медичних препаратів, НАН України, інститут біоорганічної хімії і органічної хімії) або середовище RPMI – 1640 (Roswell Park Memorial Institute).

РЕАКТИВИ

1. Натрію хлорид, кваліфікації “хч”, ГОСТ 4233-77
2. Калію дигідрофосфат, кваліфікації “чда”, ГОСТ 4198-75
3. Натрію гідроортофосфат зневоднений, кваліфікації “чда”, ГОСТ 11773

4. Фарба Романовського - Гімза, ТУ 6-09-07-1463-85
5. Сироватка великої рогатої худоби, (з-д медпрепаратів, м.Київ)
6. Фітогемаглютинін, стерильний («Реакхим» НПО «Биолар»)
7. ГЕПЕС – N-2-гідроксиетилпіперазин-N-2-етан-сульфонова кислота
8. Стрептоміцину сульфат, стерильний
9. Бензилпеніциліна калієва сіль
10. Глутамін (“Борщагівський фармзавод”, Україна)
11. Конкановалін-А, («Sigma», США)
12. Метанол, ГОСТ 6995-77
13. Декстран
14. Соляна кислота, кваліфікація “ч” ГОСТ 3118-77
15. Хлорид амонію, кваліфікація “чда”, ГОСТ 9264-71

РОЗЧИНИ

1. Приготування забуференого фізіологічного розчину (ЗФР) (стерильний) рН 7,2 - 7,4: наважки хлориду натрію 8,015 г, дигідрофосфату калію 0,41, гідрофосфату натрію зневодненого 1,78 г, зважених з точністю 0,005 г, розчинити в дистильованій воді в мірній колбі місткістю 1000 мл, долити дистильовану воду до об'єму приблизно 950 мл, ретельно перемішати та перевірити рН. При необхідності довести рН до 7,2, після чого розчин долити водою до мітки і ще раз перевірити рН.
2. Приготування лізуючого розчину (рН 7,2) (стерильний): змішати 9 об'ємів розчину А з 1 об'ємом розчину Б.
 Приготування розчину А – 0,83% (мас/об'єм) розчин хлориду амонію. Наважку хлориду амонію 8,3 г зваженого з точністю 0,005 г розчинити в дистильованій воді в мірній колбі місткістю 1000 мл, долити дистильовану воду до об'єму приблизно 950 мл, ретельно перемішати та долити водою до мітки і ще раз перемішати.
 Приготування розчину Б – 2,06% (мас/об'єм) розчин трису, рН 7,65. Наважку трису 2,06 г зваженого з точністю до 0,005 г розчинити в дистильованій воді в мірній колбі місткістю 100 мл, долити воду приблизно до об'єму 90 мл і довести рН до 7,65 за допомогою 0,1 М розчину НСІ. Стерилізують фільтруванням через мембрану.
3. 1,8% розчин декстрану (стерильний): 18 г декстрану, зваженого на електронних терезах з точністю до 0,005 г, розчинити в дистильованій воді в мірній колбі місткістю 1000 мл, долити дистильовану воду до об'єму приблизно 950 мл, ретельно перемішати та долити водою до мітки.
16. Середовище для росту клітин: наважки глутаміну 15 мг, ГЕПЕРС 238 мг, стрептоміцину 50 мг, пеніциліну 100 ОД, зважених з точність 0,005 г внести в мірну колбу місткістю 100 мл. Відмірити 50 мл 199 середовища і внести в колбу з сухими наважками, додати 5% сироватки 2,5 мл.

ХІД ВИКОНАННЯ

1. Приготування лейкоконцентрату з цільної крові.

До 1мл венозної гепаринізованої (25 ОД/мл) крові додати 1мл ЗФР акуратно перемішати. В пробірку внести 1 мл градієнту щільності, на нього нашарувати 2 мл підготовленої крові.

Центрифугувати 30 хв при 1500 об/хв.

Відібрати верхній шар та вилити.

В центрифужну пробірку зібрати лейкоконцентрат, додати до мітки 5мл ЗФР, центрифугувати 5 хв при 1500 об/хв..

Надосад повністю злити, пробірку залишити в штативі на 1-2 хв. Клітини ресуспендувати зтрусунням, ще раз відмити за попередніми вказівками.

При умові присутності еритроцитів провести їх руйнацію лізуючим розчином для чого до осаду додати 1 мл лізуючого розчину, ресуспендувати та залишити на 40 сек, потім додати 5 мл ЗФР, центрифугувати 10 хв при 1500 об/хв.

Надосад злити повністю. Провести підрахунок кількості клітин в осаді та довести концентрацію до $3-4 \times 10^6$ /мл. Відмиті клітини використовувати для проведення методики.

Підрахунок клітин в осаді.

Підрахувати кількість клітин в 1мл суспензії. В пробірку внести 10 мкл суспензії, додати 10 мкл розчину трипанового синього. Підготувати камеру Горяєва: протерти камеру з сіткою і покривне скло бяззю так щоб вона була суха. Після чого притерти скло до камери, легко надавлюючи його. Заповнити камеру попередньо приготованою суспензією, яку треба ретельно перемішати. Скляну паличку занурити в суміш і піднести до краю покривного скельця, слідкуючи за тим, щоб суспензія без бульок повітря заповнила поверхню сітки та не затікала в борізки. Заповнену камеру залишити в горизонтальному положенні на 1 хв для осідання клітин. Не змінюючи горизонтального положення камери, розмістити її на столику мікроскопу і підрахувати число живих, незабарвлених клітин в ста великих квадратах (а).

Розрахунок числа живих клітин в одному мл суспензії проводять виходячи із розведення суспензії (2), числа квадратів (100) та об'єму одного великого квадрата (1/250000 мл, оскільки сторона квадрата 1/50 см, висота його 1/100 см): $X = 50000a$

де X – число живих клітин в 1 мл суспензії; а – число живих клітин в 100 великих квадратах.

Після цього концентрацію клітин довести до 4×10^6 /мл ЗФР. Об'єм ЗФР (V, мл), який необхідно додати до V_0 мл отриманої суспензії, розрахувати за формулою $V = V_0 (X/4 \times 10^7 - 1)$

Відміряти потрібну кількість ЗФР, долити в посуду, в якій міститься суспензія клітин об'ємом V_0 , та добре перемішати барботуванням.

Довести концентрацію клітин до $2-4 \times 10^6$ /мл ростовим середовищем.

В імунологічний планшет внести в 2 лунки по 200 мкл лейкоконцентрату:

В першу лунку внести 20 мкл ростового середовища (спонтанна РБТЛ)

В другу лунку 20 мкл ФГА (індукована РБТЛ)

Культивувати 48 годин при температурі 37°C у вологій камері.

Після інкубації зняти надосадову рідину, осад ресуспендувати і перенести на предметне скло.

Висушити. Зафіксувати зануренням в метанол на 7 хв. Фарбувати фарбою по Романовському на протязі 5 хв. Мазки промити дистильованою водою і висушити при кімнатній температурі.

Оцінка результатів: Рахувати на 100 клітин кількість бластів і лимфоцитів. Індекс реакції бласттрансформації (РБТЛ) вираховувати за формулою:

$ИИ = \% \text{ бластів в мазках з коНА} / \% \text{ бластів спонтанної бласттрансформації}$

Нормальні значення: $ИИ < 2,5$

Література: Иммуннологические методы / Под ред. Г. Фримеля М: Медицина, 1987.- С. 128.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ФАГОЦИТАРНОЇ АКТИВНОСТІ НЕЙТРОФІЛІВ ПРИНЦИП МЕТОДУ

В основі методу лежить здатність фагоцитів (нейтрофілів) захоплювати частинки латексу, які забарвлюються по Романовському-Гімза, в блакитно-синій колір.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Терези електронні ВЛЕ – 134, ГОСТ 24104-88
2. Мікроскоп біокулярний Биолам Р 11, (Ломо, Росія). Об'єктив 90х, окуляр 7х
3. Піпетка скляна градуйована місткістю 5мл II клас, ГОСТ 20292 – 74
4. Планшет одноразовий імунологічний 96 лунковий, ТУ 64-2-278-79
5. Предметні скельця, ГОСТ 9289-59
6. Пробірки мірні центрифужні, ГОСТ 25336-82
7. Термостат ТС-80М-2, ТУ 64-1-1382-83
8. Центрифуга ОПН-3, ТУ5375-4260-76
9. Центрифуга РС-6 УХЛ42 з планшетотримачами, ТУ 5375-4263-80
10. Штатив поліетиленовий для пробірок ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669-83
11. Клавійний лічильник для підрахунку формених елементів крові, (ЗМА, Київ)
12. Дозатор піпетковий П1-0,02, П1-0,05, П1-0,1, ТУ 64-1-3329-81

РЕАКТИВИ

1. Латекс (суспензія монодисперсна твердих сферичних часточок (меламіно-форма-льдегідної смоли) діаметром 1,44 мкм з відносним відхиленням не більше 5%)
2. Масло імерсійне для мікроскопії (НПФ «Синбіас»)
3. Розчин Гепарину (25000 ОД в 5 мл), стерильний для ін'єкцій, («Nordmark» Німеччина)
4. Фарба Романовського-Гімза, ТУ 6-09-07-1463-85
5. Фарба-фіксатор Мая-Грюнвальда, (Диахим-Гемистейн-М, С. Петербург)
6. Натрію хлорид, кваліфікація «чда», ТУ 609-3658-74

РОЗЧИНИ

1. Стандартна суспензія латексу 0,05%: 0,1 мл суспензії латексу внести у центрифужну пробірку, додати фізіологічного розчину до 10 мл, закрити гумовою пробкою, добре розмішати струшуванням. Центрифугувати при 3000 об/хв протягом 10 хв. Надосадову рідину злити, набрати 0,02 мл щільного осаду. Додати фізіологічного розчину до 10 мл. Ресуспендувати. 2,5 мл суспензії перенести в пробірку, додати 7,5 мл фізіологічного розчину. Розчин зберігати при температурі 4-12°С. Термін зберігання 5 діб. Перед використанням ретельно перемішати.
2. Хлорид натрію 0,15 М розчин: наважку хлориду натрію 8,78 г зважену з точністю 0,005 г розчинити в дистильованій воді в мірній колбі місткістю 1000 мл, долити дистильовану воду до об'єму приблизно 950 мл, ретельно перемішати, долити водою до мітки і ще раз перемішати. Зберігати при температурі 8-10°С одну добу.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. В лупку планшету внести дозатором 0,05 мл цільної крові, до якої попередньо додати розчин гепарин-натрій з розрахунку (1 крапля розчину гепарину на 1 мл крові), 0,05 мл суспензії латексу, старанно перемішати піпетуванням.
2. Інкубувати в термостаті 30 хв при температурі 37°С.
3. Центрифугувати при 1500 об/хв протягом 10 хв.
4. Зібрати надосадову рідину і вилити геть. Осад ресуспендувати піпетуванням.
5. Краплю осаду перенести на предметне скло і зробити тонкий мазок.
6. Мазок фіксувати фарбою-фіксатором Мая-Грюнвальда 40 сек. Додати дистильованої води в тому об'ємі, що і фарби. Залишити на 20 хв при кімнатній температурі. Фарбу змити дистильованою водою, мазок висушити на повітрі.

7. Дифарбувати фарбою Романовського-Гімза у розведенні (1 крапля фарби на 10 мл дистильованої води) протягом 20 хв. Змити дистильовану воду, висушити на повітрі.

Розрахунок результатів: підрахунок проводити на 100 нейтрофілів в чотирьох паралелях за допомогою мікроскопу з використанням імерсійного об'єктиву на х90 окулярів х7. Підрахувати кількість клітин з латексом та клітин без нього. 100 нейтрофілів прийняти за 100 %, тоді відсоток фагоцитозу вирахувати за формулою:

$$\% \text{ фагоцитозу} = \frac{\text{кількість клітин з латексом}}{\text{загальна кількість клітин}} \times 100\%$$

Нормальні значення фагоцитарної активності нейтрофілів: 2% - 90%.

Література: Лебедев К.А., Понякина И.Д. / Иммунограмма в клинической практике.- М.: Наука, 1990. – С. 91-101.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ КИСЕНЬ – АКТИВУЮЧОЇ ЗДАТНОСТІ НЕЙТРОФІЛІВ ЗА НСТ – ТЕСТОМ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Зрілі гранулоцити здатні відновлювати за рахунок активних форм кисню безбарвний фарбник тетразолієвого ряду – нітросиній тетразолій (НСТ) до перозчиненої форми – диформазану, який має темно-синій колір.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Дозатор піпетковий П1-0,02, П1-0,05, П1-0,1, ТУ 64-1-3329-81
2. Терези електронні ВЛЕ-134, ГОСТ 24104-88
3. Піпетка скляна градуйована місткістю 5 мл, II клас, ГОСТ 20292 – 74
4. Планшет одноразовий імунологічний 96 лунковий, ТУ 64-2-278-79
5. Предметні скельця, ГОСТ 9289-59
6. Пробірки мірні центрифужні, ГОСТ 25336-82
7. Термостат ТС-80М-2, ТУ 64-1-1382-83
8. Центрифуга ОПН-3, ТУ5375-4260-76
9. Центрифуга РС-6 УХЛ42, ТУ 5375-4263-80
10. Штатив поліетиленовий для пробірок ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669-83
11. Мікроскоп бінокулярний Биолам Р 11, («Ломо», Росія). Об'єktiv 90х, окуляр 7х
12. Водяна баня
13. Колба мірна місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74

14. Клавішний лічильник для підрахунку формених елементів крові (ЗМА, Київ)

15. Циліндр мірний місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74

РЕАКТИВИ

1. Спирт етиловий 96°, ГОСТ 5962-67

2. Ефір для наркозу стабілізований, (Шостка, Україна)

3. Розчин Гепарину (25000 од. в 5 мл), стерильний для ін'єкцій, (Nordmark, Німеччина)

4. Масло імерсійне для мікроскопії (НПФ «Синбіас»)

5. Гліцерин, кваліфікація «чда», ГОСТ 6259-75

6. Нітросиній тетразолій (НСТ), ТУ 6-09-07-1265-81

7. Натрію хлорид, кваліфікація «чда», ГОСТ 4233-77

8. Сафранін, («Chemapol», Чехословаччина)

РОЗЧИНИ

1. 0,1% розчин НСТ: наважку НСТ 0,1 г зважену з точністю 0,005 г перенести в мірну колбу місткістю 100 мл, долити 0,15 М розчином хлориду натрію до мітки. Термін зберігання розчину 1 доба.

2. 0,15 М розчин хлориду натрію: наважку хлориду натрію 8,78 г зважену з точністю до 0,005 г розчинити в дистильованій воді в мірній колбі місткістю 1000 мл. Долити дистильовану воду до об'єму приблизно 950 мл, ретельно перемішати, долити водою до мітки і ще раз перемішати. Термін зберігання розчину 1 доба.

3. Суміш Нікіфорова: 50 мл етилового спирту та 50 мл ефіру перенести в мірну колбу місткістю 100 мл, перемішати. Зберігати в посуді з темного скла з притертою пробкою в прохолодному місці віддаленому від вогню.

4. 1% розчин сафраніну: наважку сафраніну 1,0 г зважену з точністю 0,005 г перенести у хімічну термостійку колбу, додати приблизно 50 мл дистильованої води. Розчинити розчин на водяній бані при температурі 50°-70°C до повного розчинення сафраніну, розчин остудити. Кількісно перенести розчин в мірну колбу місткістю 100 мл та долити дистильованою водою до мітки, старанно перемішати. В колбу місткістю 200 мл внести 40 мл гліцерину та 100 мл розчиненого сафраніну, перемішати. Розчин стійкий.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. В лунку планшету внести дозатором піпетковим 0,05 мл цільної крові, до якої попередньо додати розчин гепарину (5000 од/мл) з розрахунку 1 крапля на 1мл крові, та 0,05 мл розчину НСТ, старанно перемішати піпетуванням.

2. Інкубувати в термостаті 30 хв при температурі 37° С.

- Центрифугувати при 1500 об/хв протягом 5 хв.
- Дозатором піпетковим зібрати надосадову рідину, вилити геть. Осад ресуспендувати піпетуванням.
- Краплю осаду перенести на предметне скло і рівномірно розподілити по поверхні скла тонким шаром за допомогою шліфованого скла.
- Мазок фіксувати, занурюючи скло на 40 сек в суміш Нікіфорова .
- Мазок висушити при кімнатній температурі. Фарбувати розчином дифраніну протягом 20 хв. Змити дистильованою водою, висушити на повітрі.

Оцінка результатів: Підрахунок результатів проводити за допомогою мікроскопу ЛОМО з використанням імерсійного об'єктива на х90 окулярів на 7х. Підрахувати кількість клітин що містять гранули синього кольору. Розрахувати середній цитохімічний коефіцієнт (К)

$$K = \frac{a \times 4 + b \times 3 + c \times 1 + d \times 0}{100}$$

- кількість клітин, що дають яскраво виражену позитивну реакцію;
- кількість клітин, що дають виражену позитивну реакцію;
- кількість клітин, що дають слабо виражену позитивну реакцію;
- не дають позитивної реакції.

Нормальні значення здорових людей - 1,5.

Література: Логинский В.Е. , Коробкин В.В Лабораторное дело.- 1978.-№1.-С.3.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ЛІЗОСОМАЛЬНИХ КАТІОННИХ БІЛКІВ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Позитивну реакцію на катіонні білки дають лізосоми нейтрофільних, монофільних гранулоцитів крові людини, які бромфеноловим синім забарвлюються в синій колір.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

- Терези електронні ВЛЕ-134, ГОСТ 24104-88
- pH метр – мілівольтметр, тип рН 150, ГОСТ 22261-8-82
- Водяна баня
- Колба мірна місткістю 1000 мл, ГОСТ 1770-74
- Клавішний лічильник для підрахунку формених елементів крові, (ЗМА, Київ)
- Мікроскоп бінокулярний Биолам Р 11, («Ломо», Росія), об'єктив 90х, окуляр 7х
- Піпетка скляна градуйована місткістю 5 мл, ГОСТ 1770-74

8. Предметне скельце, ГОСТ 9289-59
9. Стакан хімічний місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74
10. Циліндр мірний місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74

РЕАКТИВИ

1. Бромфеноловий синій (індикатор), кваліфікація «чда» ТУ 6-09-1058-76
2. Гліцерин, кваліфікація «чда» ГОСТ 6259-75
3. Кислота соляна, кваліфікація «чда», ГОСТ 3118-77
4. Натрій тетраборно кислий, кваліфікація «чда», ГОСТ 41-96-66
5. Сафранін, («Сметарол», Чехія)
6. Сульфосаліцилова кислота, кваліфікація «чда», ГОСТ 4478-78

РОЗЧИНИ

1. Боратний буфер 0,05 М рН 8,2:

наважку натрію тетраборату 9,75 г зваженого з точністю 0,005 г розчинити в мірній колбі місткістю 1000 мл дистильованою водою.

0,1М розчин соляної кислоти: 9 мл концентрованої соляної кислоти перенести в мірну колбу місткістю 1000 мл, додати до мітки дистильованої води, перемішати

Змішати 57,5 мл натрію тетраборату та 42,5 мл 0,1М соляної кислоти, ретельно перемішати та перевірити рН. При необхідності доводити рН до 8,2 соляною кислотою 0,1М.

2. 5% розчин сульфосаліцилової кислоти: наважку сульфосаліцилової кислоти 5 г зважену з точністю 0,005 г перенести в мірну колбу місткістю 100 мл, розчинити в дистильованій воді, ретельно перемішати. Розчин стійкий.

2. 1% розчин сафраніну: наважку сафраніну 1,0 г зважену з точністю 0,005 г перенести у хімічну термостійку колбу, додати приблизно 50 мл дистильованої води. Розчинити розчин на водяній бані при температурі 50° - 70°С до повного розчинення сафраніну, розчин охудити. Кількісно перенести розчин в мірну колбу місткістю 100 мл та долити дистильованою водою до мітки, старанно перемішати. В колбу місткістю 200 мл внести 40 мл гліцерину та 100 мл розчиненого сафраніну, перемішати. Розчин стійкий.

3. 0,1% розчин бром фенолового синього: наважку бром фенолового синього 0,1 г зважену з точністю 0,005 г перенести в мірну колбу місткістю 100 мл, додати дистильованої води до мітки.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. Приготувати мазок капілярної крові на предметному склі.
2. Висушити на повітрі мазки, зафіксувати сульфосаліциловою кислотою 90 сек. Старанно промити дистильованою водою.

1. Висушити при кімнатній температурі.
2. В хімічний стакан налити 0,1% розчин бром фенолового синього, окислити повністю мазок та витримати 90 сек.
3. Мазки промити в трьох змінах боратного буфера по 2 хв в кожному розчині.
4. Висушити мазки при кімнатній температурі. На всю поверхню висушених мазків нанести розчин сафраніну на 5 сек.
5. Старанно промити дистильованою водою. Висушити при кімнатній температурі.

(Оцінка результатів): Розрахувати середній цитохімічний коефіцієнт (К).

$$K = \frac{a \times 4 + b \times 3 + c \times 1 + d \times 0}{100} \quad \text{де,}$$

- a - кількість клітин, що дають яскраво виражену позитивну реакцію;
- b - кількість клітин, що дають виражену позитивну реакцію;
- c - кількість клітин, що дають слабо виражену позитивну реакцію;
- d - не дають позитивної реакції.

Нормальні величини: 1,5±0,05.

Література: Пигаревский В.Е. / Зернистые лейкоциты и их свойства, - М. Медицина, 1978. - С. 98.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ПОСТАНОВКИ ПРЯМОЇ ПРОБИ КУМБСА

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Проба оснований на виявленні фіксованих (адсорбованих) на еритроцитах антитіл за допомогою антиглобулінової сироватки. До досліджуваних еритроцитів (що містять на собі антитіла) додають антиглобулінову сироватку (сироватка для проби Кумбса). Білки антиглобулінової сироватки преципітують антитіла, адсорбовані на поверхні еритроцитів, викликаючи їхню аглютинацію.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Планшет імунологічний 96-лунковий, ТУ 64-2-278-79
2. Дозатор піпетковий 2-20 мкл, ТУ 64-1-3329-81
3. Колба мірна місткістю 100, 1000 мл, ГОСТ 10394-72
4. Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74
5. Центрифуга ОПн-3 УХЛА, 2 ТУ 5.375-4260-76

РЕАКТИВИ

1. Натрію хлорид, кваліфікація "хч", ГОСТ 4233-77
2. Калію дигідрофосфат, кваліфікація "чда", ГОСТ 4198-75

3. Натрію гідроортофосфат зневоднений, кваліфікація "чда", ГОСТ 11773
4. Антиглобулінова сироватка (ТОО «Гематолог»)

РОЗЧИНИ

1. Приготування забуференого фізіологічного розчину (ЗФР) (стерильний) рН 7,2 - 7,4: наважки хлориду натрію 8,015 г, дигідрофосфату калію 0,41 г, гідрофосфату натрію зневодненого 1,78 г, зважених з точністю 0,005 г, розчинити в дистильованій воді в мірній колбі місткістю 1000 мл, долити дистильовану воду до об'єму приблизно 950 мл, ретельно перемішати та перевірити рН. При необхідності довести рН до 7,2, після чого розчин долити водою до мітки і ще раз перевірити рН.

ХІД ВИКОНАННЯ

1. До 1 мл гепаринізованої крові додати 6 мл фізіологічного розчину.
2. Центрифугувати 5 хв при 1500 об/хв. Надосад злити.
3. З відмитих еритроцитів приготувати 5% суспензію.
4. В усі лунки імунологічного планшету (крім першої) внести по 0,05 мл ЗФР потім у 2 перші лунки імунологічного планшету внести по 0,05 мл сироватки для проби Кумбса і починаючи з другої лунки розчинити сироватку фізіологічним розчином.
5. В усі лунки внести суспензію еритроцитів, перемішати піпетуванням і залишити на 1 годину. Після закінчення інкубації відзначити при якому розведенні відбулася аглютинація.

Нормальні величини: в нормі у здорових людей антитіла відсутні.

Література: Лабораторные методы исследования в клинике / Под ред. проф. В. В. Меньшикова - М: Медицина, - 1987. - С. 124-125.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ІМУНОПІСТОХІМІЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АНТИГЕНУ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Метод оснований на взаємодії тканинного антигену із специфічними антитілами. Тканинний антиген у замороженому зрізі взаємодіє з первинними антитілами (мишачими, якщо визначаємий антиген людини). Друга реакція заключається у взаємодії антитіл до гама-глобулінів тварини, донора первинних антитіл. При цьому вторинні антитіла мітяться біотином (на одну молекулу вторинних антитіл приходиться до 150 молекул біотину). Третя реакція – включає взаємодію біотину зі стрептавідин-пероксидазою. Ця (пероксидазна) реакція виявляється у результаті проявочної реакції з аміноетілкарбазолом (АЕС) з утворенням забарвленого продукту реакції.

Для оцінки досліджу проводять негативний контроль із нормальною мишачою провраткою замість первинних антитіл, який не дає забарвлення.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Сосуд Д'юара АСД-16, ГОСТ 5877-71
2. Мікротом заморожуючий
3. Предметні стекла, ГОСТ 9289-59
4. Дозатор піпетковий П1- 0,2 , П1-0,5, П1-0,002, ТУ 64-1-3329-81
5. Терези електронні ВЛЕ 134 ГОСТ 24104-88
6. Секундомір, тип СОС пр.-26-2-000, ТУ 23-1894.003-90
7. Терези торсійні ТУ 64-1-990-81
8. Терези лабораторні ВЛР-200, ГОСТ 19491-74
9. Колба мірна місткістю 50 мл, 100 мл ГОСТ 10394-72
10. Стакани хімічні, місткістю 100 мл ГОСТ 10394-72
11. Циліндри мірні, місткістю 100, 250, 1000 мл, ГОСТ 1770-74
12. Холодильник побутовий ТУ 27-56-982-83, ГОСТ 16317-76
13. Термостат сухоповітряний ТС-80М-2 ТУ 64-1-1382-83
14. рН-метр-мілівольтметр, тип рН-150, ГОСТ 22261-82
15. Мікроскоп біокулярний "Люам - Р - 8" (Ломо, Росія)
16. Освітлювач для мікроскопа ОИ-8 (Ломо, Росія)
17. Волога камера
18. Лійка скляна, ГОСТ 25336-82
19. Вкриті адгезивним розчином предметні стекла або предметні скельця, оброблені Novobond Slide Tissue Adhesive ("Novo Castra", United Kingdom)
20. Покровні скельця $2,0 \pm 0,2$
21. Водяна баня
22. Плита електрична з закритою спіраллю УШП-1-0,8/220, ГОСТ 14919-83

РЕАКТИВИ

1. Карбоксиметил-целюлоза (Sigma, USA)
2. Кислота соляна концентрована, кваліфікація "чда", ГОСТ 3118-77
3. Рідкий азот ГОСТ 9293-91
4. Парафін ТУ 6-09-3637-89
5. Спирт етиловий 96^о, ГОСТ 5962-67
6. Ацетон, кваліфікація "чда"; ГОСТ 2768-84
7. Моноклональні антитіла («Сорбент», Росія) та/або (Sigma, USA)
8. Екстравідин-пероксидазний комплекс (EXTRA-2 I kit Lot 87H4885, (Sigma, USA), або вторинні антитіла, мічені пероксидазою хріна («Сорбент», Росія)
9. Водню пероксид, кваліфікація "чда", ГОСТ 10929-76
10. Аміноетилкарбазол (AEC), (Sigma, USA)
11. Гемалаун Майєра (Sigma, USA)

2. Кислота лимона, кваліфікація "ч", ГОСТ 3652-69
3. Натрію цитрат зневоднений, кваліфікація "чда", ГОСТ 22280-76
4. Гуміарабік (Sigma, USA)
5. Сахароза, кваліфікація "чда", ГОСТ 3833-75
6. Тімол, кваліфікація "ч" ТУ 6-09-3736-79
7. Натрію ацетат трьохводний, кваліфікація "чда", ГОСТ 199-68
8. Кислота оцтова льодяна, кваліфікація "чда", ГОСТ 61-75
9. Диметилформамід, кваліфікація "ч", ГОСТ 20289-74

РОЗЧИНИ

1. 6% розчин карбоксиметилцелюлози у дистильованій воді. У хімічний стакан, місткістю 100 мл, внести 6 г карбоксиметилцелюлози, зваженої на терезах електронних, довести дистильованою водою до 100 мл. Ретельно перемішати, зберігати при +4°C, на протязі 2 тижнів.
2. Розчин для протравки предметних стекол: 1% розчин соляної кислоти в 70% етанолі. 7,4 мл концентрованої соляної кислоти перенести у флакон з темного скла на 500 мл, додати 182,5 мл 96° етанолу, додати 67,5 мл дистильованої води. Перемішати. Розчин розрахований на обробку 300 стекол. Зберігати при температурі +4°C.
3. Цитратний буфер рН 6.0: У колбу, місткістю 100 мл внести 0,24 г лимонної кислоти і 3,19 г натрію цитрату, зважених на електронних терезах, розчинити в неповному об'ємі дистильованої води. Перемішати. Виміряти рН. Довести розчин дистильованою водою до мітки. Термін зберігання при температурі +4°C - 1 місяць.
4. Фосфатно-сольовий буферний розчин (ФСБ) рН 7,2-7,4. В мірну колбу на 2000 мл внести 2,32 г натрію моногідрофосфату, 15,64 г натрію хлориду, 0,5 г калію дигідрофосфату, розчинити в неповному об'ємі дистильованої води. Перемішати. Виміряти рН. Довести розчин дистильованою водою до мітки. Термін зберігання при температурі +4°C - 1 місяць.
5. Пероксид водню 0,3%. До 100 мл дистильованої води додати 1 мл концентрованого (33%) пероксиду водню. Готувати *ex tempore*!
6. Ацетатний буфер 0,05 М (рН 5,0). У мірну колбу, місткістю 250 мл внести 1,09 г натрію ацетату трьохводного, зваженого на електронних терезах, розчинити в неповному об'ємі дистильованої води. Перемішати. Додати 0,25 мл кислоти оцтової льодяної. Виміряти рН. Довести дистильованою водою до 250 мл. Термін зберігання при температурі +4°C - 1 місяць.
7. Розчин АЕС. У чистий флакон з темного скла, місткістю 5 мл помістити 1 таблетку АЕС. Додати 2,5 мл диметилформаміда. Розчин готувати під витяжною шафою, у гумових рукавичках (потенційний канцероген!). Зберігати у щільно укуповеному посуді. Термін зберігання при температурі +4°C - 1 місяць.

9. Підготувати необхідне розведення АТ₁ у фосфатно-сольовому буферному розчині 1:5 (розведення підбирається дослідним шляхом).
10. Нанести на зрізи АТ₁ у кількості 4-5 мкл на кожний зріз. Обережним погойдуванням рівномірно розподілити реактив на зрізі.
11. Інкубувати:
 - а) для поверхневих антигенів і малих пропорцій розчинення первинних антитіл – при температурі +37°C – 1 годину, у термостаті у вологій камері
 - б) для внутрішньоклітинних антигенів та при тестуванні первинних антитіл – при температурі +4°C – 14-16 годин, у холодильнику у вологій камері.
12. Декілька разів змити АТ₁ фосфатно-сольовим буферним розчином з піпетки й занурити у фосфатно-сольовий буферний розчин на 5 хв.; провести дві відмивки по 5 хв., змінюючи фосфатно-сольовий буферний розчин. Різні АТ₁ відмивати в різних стаканчиках (!).
13. Видалити зайву вологу навколо зрізу, не допускаючи підсушування зрізу.
14. Підготувати необхідне розведення АТ₂ (біотинильованих) у фосфатно-сольовому буферному розчині, або АТ₂, мічених пероксидазою хрину (розведення підбирається дослідним шляхом).
15. Нанести на зрізи АТ₂ у кількості 4-5 мкл на кожний зріз.
16. Інкубувати у термостаті при температурі + 37 °C, у вологій камері:
 - а) для АТ₂ біотинильованих – 1 годину;
 - б) для АТ₂, мічених пероксидазою хрину – при температурі +37°C – 1,5 години в термостаті, у вологій камері (пероксидаза-антипероксидазний (ПАП) метод). Для ПАП-методу цей етап є заключним.
17. Відмити від АТ₂ фосфатно-сольовим буферним розчином два рази по 10 хв.
18. Нанести на зрізи АТ₃ у необхідному розведенні та інкубувати при температурі +37°C – 30 хв. Цей етап стосується біотин-екстравідин-пероксидазного варіанту методу.
19. Відмити від АТ₃ у двох змінах фосфатно-сольового буферного розчину по 5 хв.
20. Видалити надлишки вологи. Зрізи готові до проявки.

Проявка реакції.
21. Приготувати ex tempore проявочну суміш й нанести на зрізи на 10 хв. при температурі повітря +19 - 22 °C (при нижчій температурі слід збільшити тривалість проявки).
22. Змити проявочну суміш, зануривши зрізи у дистильовану воду на 5 хв. Забарвлення препарату.
23. Видалити надлишки вологи навколо зрізів й нанести гемалаун Майсра на 15 хв.
24. Занурити зрізи у теплу водопровідну воду. Витримати 10 хв. – до розвитку синьо-фіолетового забарвлення.
25. Висушити зрізи на повітрі, не допускаючи попадання пилу.
26. Нанести гуммі-сироп, покрити зрізи покровними скельцями.
27. Окантувати парафіном.

Література: 1. Глузман Д. Ф., Абраменко И.В., Скіярєнко Л.М., Писнячєвская І. В. Иммуноцитохимическая диагностика злокачественных экссудатов, Киев. Наукова думка.-1993.-С.133-140. – 2. Дж. Полак, С. Ван Норден. Введение в иммуноцитохимию: Современные методы и проблемы // Перевод с англ. Глуховой М. А., под ред. Хрушова Н. Г.-М.: «Мир».-1987.-74с. – 3. Лимфоциты. Методы /Под ред. Дж.Клауса. Перевод английского Маца А.Н. и Фельдшеровой А.А. Под ред. Маца А.Н., М.: Мир.-1990.-С.158-161. – 4. Микроскопическая техника /Руководство для врачей и лаборантов. Под ред. Д. С. Саркисова и Ю. Л. Петрова // М.: «Медицина», 1996. – 5. Пат. 2001096503 Украина, МПК 7 А61 С17/00. Спосіб оцінки функціонального стану слизової оболонки порожнини рота: Пат. 2001096503 Украина, МПК 7 А61 С17/00/ Кайдашев І. П., Скаменко П. І., Курєдова В. Д., Карасюнок О. О., Шинкевич В. І., Баштовенко О. А (Украина); №41428; Заявл.24.09.2001; Опубл.10.06.2002.-3с. – 6. Тотолян А. А., Бандуєва І. А., Бубнова Л. Н., Закревская А. В, Зуєва Е. Е. Стандартизация методов иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга человека // Клиническая лабораторная диагностика.-2002.- №1.-С.44-50.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ОТРИМАННЯ ТКАНИННИХ ЕКСТРАКТІВ ДЛЯ ІМУНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Більша частина антигенів знаходиться на зовнішній мембрані клітин. Виділення тканинних антигенів за допомогою 3 М хлориду калію вірогідно відбувається внаслідок аутоферментативних реакцій. Антигени з м.м. 80-160 кД мають здебільше гістоспецифічні та індивідуальні антигени, антигени з м.м. 50-70 кД та > 200 кД - перехресно реагуючі антигенні компоненти.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Вихідний матеріал: пухлинна тканина з гістологічним підтвердженням; секційний матеріал нормальних тканин не пізніше 8 годин після смерті; ембріональна тканина. Проби тканин можна зберігати при -25°C багато місяців.
2. Хірургічний набір: ножиці, пінцет, скальпель, корнцанг (сертифікат якості ISO 9002)
3. Гомогенізатор з ножами
4. Центрифуга ОПн-3 УХЛА, 2, ТУ 5.375-4260-76
5. Холодильник побутовий, ТУ 84-89
6. Діалізні мембрани
7. Колонка хроматографічна 32x1200 мм
8. Спектрофотометр СФ-46, ТУ 3-3. 1841-84, (Ломо, Росія)
9. рН-метр-мілівольтметр тип рН-150, ГОСТ 22261-8-82

РЕАКТИВИ

1. Поліетиленгліколь мол. мас. 20000 (ПЕГ), (Loba Feinchemie)
2. Сульфат амонію, кваліфікація «чда», ГОСТ 96-56-75
3. Натрій фосфорнокислий двоаміщений, кваліфікація «чда», ТУ 64-64-72

4. Калій фосфорнокислий однозаміщений, кваліфікація "ч", ГОСТ 4198-65
5. Сефадекс G-200
6. Хлорид калію, кваліфікація "чда", ГОСТ 4234-77

РОЗЧИНИ

1. Фосфатно-сольовий буфер (ФСБ), рН 7,2: наважки важки реактивів зважено: з точністю 0,005 г натрію фосфорнокислого двоаміщеного 1,16 г, калію фосфорнокислого однозаміщеного 0,25 г, хлориду натрію 7,82 г розчинити в дистильованій воді в мірній колбі місткістю 1 л, перемішати. Перевірити рН.
2. 0,15 М фосфатний буфер, рН 7,2: наважки реактивів зважені з точністю 0,005 г фосфату натрію двоаміщеного - 17,32 г, калію фосфорнокислого однозаміщеного - 3,78 г розчинити в дистильованій воді в мірній колбі місткістю 1 л, перемішати. Перевірити рН розчину.
3. Хлорид калію 3 М в ФСБ: наважку хлориду калію 223,5 г зважену з точністю 0,005 г перенести в мірну колбу місткістю 1000 мл, додати невелику кількість буферу ФСБ, розчинити, перемішати, довести об'єм до мітки. Перемішати.
4. Розчин сульфату амонію в 0,15 М фосфатному буфері рН 7,2: сульфат амонію додати в розчин 0,15 М фосфатного буферу до появи нерозчинного осаду. Розчин обережно злити з осаду, профільтрувати.

ХІД ВИКОНАННЯ

1. Зразки тканин грубо подрібнювати в напівзамороженому стані ножицями. Потім гомогенізувати в гомогенізаторі при температурі не вище + 10° С в 3 М розчині хлориду калію в ФСБ. Співвідношення тканина/середовище 1:5 - 1:10. Гомогенат витримувати 16 годин при + 4° С.
2. Центрифугувати гомогенат 2 години при 40000 g, надосадову рідину діалізувати проти водопровідної води 3 години. Потім концентрувати до 1/5 - 1/10 вихідного об'єму за допомогою ПЕГ 20 000. Білки, що випадають у осад видалити центрифугуванням 1 годину при 20000 g.
3. Провести осаджування центрифугату рівним об'ємом насиченого розчину сульфату амонію в 0,15 М фосфатному буфері протягом 12 годин при + 4° С. Осад збирати центрифугуванням, розчинити в 3-4 об'ємах ФСБ, діалізувати проти 3-4 об'ємів ФСБ (24 години). Діалізат центрифугувати 1 годину при 20000 g.
4. Провести хроматографію на колонці з Сефадекс-200 або АсА 34. Елюцію вести ФСБ, реєструвати оптичну густину фракцій при 280 нм. Розділення вести при +4° С.
5. Збирати фракції P1: = 180000; P2: 120000 - 160000; P3: 50000 - 60000.
6. Фракції концентрувати на мембранах Amicon до 1-1,5 % білка та зберігати при - 25° С.

Література: Muller M., Irmscher F., Fischer R. Immunologisches Tumorprofil. Ein neuartiges Prinzip in der Anwendung des MEM-tests zur differenzierten Kavzinomdiagnose.-Dtsch. Ges.-Wesen, 1975,30,1836-1842.

РОДЛИ 4. МЕТОДИ ПРОВЕДЕННЯ БІОХІМІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ АСПАРТАТ-АМІНОТРАНСФЕРАЗИ АСАТ (AST) І АЛАНІН-АМІНОТРАНСФЕРАЗИ АЛАТ (ALT) У СИРОВАТЦІ КРОВІ (дiнітрофенілгiдразиновим методом) (набір "Біо – Lасhета – Тест", Чехія)

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Ферменти АсАт і АлАт каталізують реакції, у кінцевому результаті яких утворюється гiдразон пірвіноградної кислоти, який у лужному середовищі дає кольорову реакцію.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74
2. Піпетки скляні градузовані місткістю 1, 5 мл, ГОСТ 20292-74
3. Колби мірні місткістю 100, 1000 мл. ГОСТ 1770-74
4. Дозатор піпетковий, П1-20, П1-200, ТУ 64-1-3329-9-81
5. Ваги електроні ВЛ Е-134, ГОСТ 104-88
6. Термостат ТС -80 М-2, ТУ 64-1-1382-83
7. Мікроколориметр медичний фотоелектричний МКМФ-1, ТУ 2Т 1.540.008

РЕАКТИВИ

1. Натрію піруват (натрій пірвінограднокислий), кваліфікація "чда" ТУ 6-09-5235-85
2. 2,4-дiнітрофенілгiдразин, кваліфікація "чда" ТУ 6-09-2394-77
3. Натрію гiдроксид, кваліфікація "чда", ГОСТ 4328-77
4. L-аспартат
5. 2-оксоглутарат
6. DL-альфа-аланін
7. Калій фосфорнокислий однозаміщений, кваліфікація "чда", ГОСТ 4198-65
8. Натрій фосфорнокислий двузаміщений безводний, кваліфікація "чда", ТУ 64-64-72
9. Натрію хлорид, кваліфікація "чда", ГОСТ 4233-77
10. Кислота соляна, кваліфікація "чда", ГОСТ 3118-77

РОЗЧИНИ

1. Стандартний розчин натрію піруват, 2 ммоль/л (у наборі)
2. 1 мМ розчин 2,4-дінітрофенілгідразину в 1 М розчині соляної кислоти (у наборі).
3. Розчин гідроксиду натрію 16 г/л: розчинити у дистильованій воді у мірній колбі місткістю 1000 мл вміст флакону з 16 г натрію гідроксиду.
4. Субстрат АсАт: L-аспартат 0,1 М; 2-оксоглутарат 2 мМ; фосфатний буфер 0,1 М, рН 7,4 (25° С) (у наборі)
5. Субстрат АлАт: DL-альфа-аланін 0,2 мМ; 2 -оксоглутарат, 2 мМ; фосфатний буфер 0,1 М, рН 7,4 (25° С) (у наборі)
6. Розчин хлориду натрію, 0,15 М: наважку натрію хлориду 8,775 г, розчинити у дистильованій воді у мірній колбі місткістю 1000 мл

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. У проби "дослід" та "контроль" внести по 0,25 мл субстрату АсАт (АлАт).
2. У пробу "контроль" внести 0,05 мл розчину хлориду натрію.
3. Проби витримати протягом 3 хвилини при 37° С.
4. У проби "дослід" внести 0,05 мл сироватки крові.
5. Всі проби інкубувати на протязі 60 хвилин при 37° С.
6. У всі проби внести по 0,25 мл розчину 2,4-дінітрофенілгідразину, перемішати.
7. Проби залишити на 20 хвилин при кімнатній температурі.
8. У всі проби додати по 2,5 мл розчину гідроксиду натрію, перемішати.
9. Через 10 хв проби "дослід" колориметрувати проти проби "контроль" при довжині хвилі 500-530 нм у кюветі 10 мм.
10. Активність АсАТ (АлАТ) визначити по калібрувальному графіку.

ПОБУДОВА КАЛІБРУВАЛЬНОГО ГРАФІКУ

1. У п'ять пробірок, яка позначені К (контроль на реактив), 1, 2, 3, 4 внести по 0,1 мл розчину хлориду натрію.
2. У названі пробірки внести відповідно 0,50; 0,45; 0,40; 0,35; 0,30 мл субстрату АсАт (АлАТ).
3. У пробірки 1, 2, 3, 4, внести відповідно 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 мл стандартного розчину пірувату натрію.
4. У всі пробірки додати по 0,50 мл розчину 2,4-дінітрофенілгідразину.
5. Вміст пробірок перемішати та витримати 20 хв при кімнатній температурі.
6. У всі пробірки додати по 5 мл розчину гідроксиду натрію.
7. Через 10 хв виміряти оптичну густину проб 1, 2, 3, 4 проти проби К при довжині хвилі 500-530 нм у кюветі 10 мм.

8. Кінцева активність проб 1, 2, 3, 4 складає відповідно 0,28; 0,56; 0,83; 1,1 мккат/л (мккат/л – кількість мкмолей піровіноградної кислоти, яка утворюється за 1 сек. з одного літру сироватки).

9. Побудувати калібрувальний графік у координатах оптична густина-активність.

При прямої пропорційної залежності розрахувати коефіцієнт пропорційності К, який знаходиться за формулою:

$$K = \frac{A}{E}$$

де А – активність, яка відповідає точці графіку, мккат/л;

Е – відповідна оптична густина цієї точки.

10. Розрахунок активності дослідної проби зробити за формулою:

$$A_{\text{докл}} = K \cdot E_{\text{докл}} \text{ мккат/л}$$

При активності ферменту вище 0,56 мккат/л аналіз повторити з сироваткою, яка розбавлена розчином хлориду натрію. Результат помножити на розведення.

При активності ферменту	Розведення
0,56-0,70	3x
0,70-0,80	5x
0,80-1,00	10x
1,00-1,20	30x
більш 1,20	50x

Нормальні значення: Активність АсАТ і АлАТ - (0,06-0,14) мккат/л.

Гранична величина – до 0,42 мккат/л.

Примітки: 1. Проби сироватки крові можна зберігати при + 5°C протягом одного тижня.

2. Гемоліз сироватки підвищує активність ферментів АсАТ та АлАТ.

3. Субстрати АсАТ та АлАТ містять хлороформ та при низькій температурі можуть каламутіти. Каламутність усувається перед використанням підігрівом розчину при 37°C.

Література: Лабораторные методы исследования в клинике / Под ред. Мельникова В.В. - М.: Медицина, 1987. – 364 с.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТИ В ТКАНИНАХ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Метод оснований на екстракції дегідроаскорбінової кислоти (ДАК) і аскорбінової кислоти (АК) за допомогою трихлороцтової кислоти (ТХО), окисленні АК до ДАК за допомогою 2,6-дихлорфеноліндофеноляту натрію

(2,6-ДХФІФ), визначенні суми (АК+ДАК) і ДАК. Вміст АК визначається порізниці (АК+ДАК)-ДАК. ДАК при реакції з 2,4-динітрофенілгідразином (2,4-ДНФГ) утворює забарвлений продукт.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74
2. Пробірки хімічні, ГОСТ 25336-82
3. Плита електрична з зак. сп. тип ЕПШ - 1-0,8, ГОСТ 14919-836
4. Штативи для пробірок поліетиленові ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669-83
5. Пілетки скляні градуйовані місткістю 2, 5 мл, 2-й клас, ГОСТ 20292-74
6. Дозатор пілетковий ПІ-0,05, ПІ-0,1, ПІ-0,5, ТУ 64-1-3329-81
7. Фарфорова ступка
8. Терези електронні ВЛ Е -134, ГОСТ 24104-88
9. Термостат ТС-80 М, ТУ 64-1-1382-83
10. Центрифуга ОПН-ЗУХЛ4.2, ТУ 5-375-42-60-76
11. Колби мірні місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74
12. Холодильник побутовий, ТУ 84-89
13. Стакани хімічні місткістю 50, 100 мл, ГОСТ 1770-74
14. Колориметр фотоелектричний концентраційний КФК-2-УХЛ 4.2, ТУ 3-3. 1766-82

РЕАКТИВИ

1. Трихлороцтова кислота (ТХО), кваліфікація "чда", ТУ 6-0,9-1926-77
2. Кислота сірчана концентрована, кваліфікація "чда" ГОСТ 4207-77
3. 2,6-Дихлорфеноліндофенолят натрію (2,6-ДХФІФ), ТУ 6-09-2808-77
4. 2,4-динітрофенілгідразин (2,4-ДНФГ), кваліфікація "чда" ТУ 6-09-2394-77
5. Тіосечовина, кваліфікація "чда" ГОСТ 6344-73

РОЗЧИНИ

1. 6% розчин ТХО: наважку ТХО масою 6 г, зважену з точністю 0,005 г, розчинити в 94 мл дистильованої води, перемішати.
2. 5% розчин тіосечовини в 6% розчині ТХО: наважку тіосечовини 5 г, зважену з точністю 0,005 г, розчинити в 95 мл 6% розчину ТХО, перемішати.
3. 0,2% розчин 2,6-ДХФІФ: наважку 2,6-ДХФІФ масою 0,2 г, зважену з точністю 0,005 г, розчинити в 99,8 мл прокип'яченій дистильованій воді, перемішати.
4. 9 н сірчана кислота: готувати змішуванням 3 частин дистильованої води і повільним проливанням 1 частини концентрованої сірчаної кислоти.
5. Розчин 2,4-ДНФГ: наважку 2,4-ДНФГ масою 2 г, зважену з точністю 0,005 г, розчинити при нагріванні до 50-60° С в 100 мл 9 н сірчаної кислоти.

На наступний день профільтрувати.

8. 85% сірчана кислота: мірним циліндром відміряти 88,4 мл концентрованої сірчаної кислоти та розчинити в 11,6 мл дистильованої води, обережно помішати.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. Приготувати центрифужні пробірки по кількості проб і стільки ж центрифужних пробірок для 6% розчину ТХО.

2. В центрифужні пробірки налити по 10 мл 6% ТХО.

3. Наважку печінки 0,2 г розтерти в ступці, додати спочатку 2-3 краплі ТХО із набраної пробірки, продовжати розтирати, поступово додаючи невеликі порції ТХО. Перенести вміст ступки в пусту центрифужну пробірку, додати, змиваючи ступку, залишок з 6% ТХО. Таким чином, в пробірці виявляється розтерта наважка і 10 мл 6% ТХО.

4. Гомогенат центрифувати при 3000 об/хв 10 хв (або фільтрувати).

5. Для кожної проби приготувати 4 хімічні пробірки і дві пробірки для контролю (загальні для всіх проб).

Пробірки 1,2 - паралельні для сумарного визначення ДАК+АК

Пробірки 3,4 - для визначення ДАК.

6. В усі пробірки прилити по 2 мл центрифугату, в контроль - 2 мл 6% ТХО.

7. В 1,2 пробірки - по 1 краплі (0,05 мл) 0,2% ДХФІФ (для окислення АК до ДАК).

8. В усі 4 пробірки - по 2 краплі (0,1 мл) 5% розчину тіосечовини (проби окислюються).

9. В 3,4 пробірки - по 1 краплі 0,2% ДХФІФ.

10. В усі пробірки (крім «контроль») - по 0,5 мл ДНФГ.

11. Всі пробірки інкубувати в термостаті 3 години при 37° С.

12. Після інкубації пробірки охолодити, в кожен пробірку обережно, по краплям прилити 2,5 мл 85% сірчаної кислоти.

13. В пробу «контроль» прилити 0,5 мл 2,4-ДНФГ.

14. Після додавання сірчаної кислоти витримати 1 год. Розчин набуває вищого-червоного кольору.

15. Проби фотометрувати при довжині хвилі 540 нм в кюветі 10 мм проти проб «контроль».

16. Екстинкцію АК визначити як різницю екстинкції 3,4 пробірок і 1,2 пробірок: $E(АК) = E(ДАК+АК) - E(ДАК)$.

17. Вміст АК визначити по калібрувальній кривій.

ПОБУДОВА КАЛІБРУВАЛЬНОЇ КРИВОЇ

Приготувати розчин, який містить 30 мкг аскорбінової кислоти в 2-х мл 6% ТХО (розчин А). Для цього 30 мг АК розчинити в 2 мл 6% розчину

ТХО. Із цього розчину відібрати 0,1 мл, помістити в колбу на 100 мл, довести до мітки розчином 6% ТХО.

Із розчину А приготувати розведення:

- 1) 2 мл «А» + 10 мл 6% ТХО — 5 мкг АК в 2-х мл розчину.
- 2) 2 мл «А» + 4 мл 6% ТХО — 10 мкг АК в 2-х мл розчину.
- 3) 4 мл «А» + 4 мл 6% ТХО — 15 мкг АК в 2-х мл розчину.
- 4) 4 мл «А» + 2 мл 6% ТХО — 20 мкг АК в 2-х мл розчину.
- 5) Розчин «А» — 30 мкг АК в 2-х мл розчину.

Для кожного розведення приготувати 2 хімічні пробірки, в які помістити по 2 мл відповідного розчину, в контрольні пробірки - по 2 мл 6% розчину ТХО. Потім АК, яка міститься в цих пробірках, окислити до ДАК за допомогою ДХФІФ і обробити, як пробу.

Отримати залежність - концентрація-екстинкція та при прямих пропорційній залежності знайти коефіцієнт пропорційності:

$$K = \frac{A_{\text{ст}}}{E_{\text{ст}}}, \text{ де}$$

$A_{\text{ст}}$ - вміст АК у стандартному розчині, мкг (кожна крапка графіку)

$E_{\text{ст}}$ - екстинкція, яка відповідна стандартному розчину.

Розрахунок:

$$AK = K \times E_{\text{ак}} \times 25, \text{ де}$$

АК - вміст аскорбінової кислоти в тканині, мкг/г (мг/кг).

K - вміст аскорбінової кислоти на одиницю екстинкції.

$E_{\text{ак}}$ - екстинкція аскорбінової кислоти у колориметруємій пробі.

25 - коефіцієнт перерахунку на г тканини (0,2 г : 5 = 0,04 г - нава тканини, що приймає участь в замірі екстинкції: 1 : 0,04 = 25)

Нормальні величини:

- вміст аскорбінової кислоти у печінки шурів - 240-380 мг/кг в залежності від маси тварини.

- вміст аскорбінової кислоти у крові шурів - 23±1,6 мг/л

Література: 1. Биохимические методы контроля метаболизма в органах тканей птиц и их витаминной обеспеченности. Методические рекомендации. Харьков, УкрНИИ птицеводства, 1990. - С. 69. - 2. Трахтенберг И.М. и др. Проблемы нормы в токсикологии. - М.: Медицина, 1991. - С. 102.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОГО БІЛКУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ЗА БІУРЕТОВОЮ РЕАКЦІЄЮ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Білки реагують в лужному середовищі з сірчаною кислотою з утворенням сполук, забарвлених в фіолетовий колір (біуретова реакція).

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. Приготувати центрифужні пробірки за кількістю проб "дослід" та пробірку "контроль".
2. В пробірки "дослід" налити по 0,05 мл сироватки, в "контроль" - 0,05 мл 0,9% розчину хлористого натрію.
3. У всі пробірки долити по 2,5 мл робочого біуретового реактиву.
4. Змішати так, щоб не утворювалася піна
5. Через 30 хв (і не пізніше, ніж через годину) виміряти оптичну густина на МКМФ в кюветі з товщиною шару 10 мм при довжині хвилі 540 нм (зелений світлофільтр) проти контролю. Розрахунок вести за калібрувальним графіком.
6. Побудова калібрувального графіка:

Із стандартного розчину альбуміну приготувати робочі стандарти розчини згідно таблиці:

Таблиця

№ пробірки	Стандартний розчин білку (мл)	0,9 % розчин хлориду натрію (мл)	Концентрація білку, (г/л)
1.	0,4	0,6	4
2.	0,6	0,4	6
3.	0,8	0,2	8
4.	1,0	-----	10

З кожного розведення взяти по 0,1 мл робочого розчину і додати по 0,1 мл робочого біуретового реактиву. Через 30-60 хв виміряти на КФК, як в досліді, проти контролю. За отриманими даними побудувати калібрувальний графік.

РОЗРАХУНОК:

Виходячи з графіку, залежність концентрації білку від екстинкції описується порівнянням

$$Y=kx, \quad \text{де}$$

Y - концентрація білку, г/л;

k - коефіцієнт пропорційності, (Y/x);

x - екстинкція розчину.

Нормальні показники: (65-85) г/л.

Примітка: При вмісті білку в сироватці крові більше 100 г/л сироватку розвести фізіологічним розчином, а результат помножити на коефіцієнт розведення.

Література: Лабораторные методы исследования в клинике / Под ред. Миньшикова В.В. - М.: Медицина, 1987. - 364 с

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ БІЛІРУБІНУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ (ПО ІЕНДРАШИКУ) (мікрометод)

ПРИНЦИП МЕТОДУ

При взаємодії сульфанілової кислоти з азотистокислим натрієм утворюється діазофенілсульфонова кислота, яка дає з прямим білірубінном рожево-фіолетове забарвлення. При внесенні до сироватки кофеїнового реактиву непрямий білірубін переходить в розчинний стан і з сумішшю діазореактивів також дає рожево-фіолетове забарвлення. По інтенсивності забарвлення визначають концентрацію прямого і загального білірубіну. По різниці загальним і прямим визначають концентрацію непрямого білірубіну.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

- 1 Пробірки скляні центрифужні, ГОСТ 1770-74
- 2 Піпетки скляні місткістю 1, 5, 10 мл, ГОСТ 20292-74
- 3 Стакан хімічний місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74
- 4 Колби мірні місткістю 50, 100 мл, ГОСТ 1770-74
- 5 Баня водяна
- 6 Дозатор піпетковий ПІ-0,05, ТУ 64-1-3329-81
- 7 Ваги електронні ВЛ Е-134, ГОСТ 104-88
- 8 Мікроколориметр медичний фотоелектричний МКМФ-1, ТУ 2Т 140.008
- 9 Шпика скляна, ГОСТ 1770-74

РЕАКТИВИ

- 1 Кофеїн, кваліфікація "хч" ("Реахим", Росія)
- 2 Натрій бензойнокислий, ТУ 6-09-2785-78
- 3 Натрій уксуснокислий, кваліфікація "чда", ТУ 6-09-246-70
- 4 Натрій азотистокислий, кваліфікація "чда", ТУ ГОСТ 12-4197-74
- 5 Натрій хлорид, кваліфікація "чда" ГОСТ 4328-77
- 6 Кислота сульфанілова, кваліфікація "чда" ГОСТ 5821-78
- 7 Кислота соляна концентрована, кваліфікація "ч" ГОСТ 3118-77
- 8 Білірубін – еталон (наприклад, фірма "Лахема")

РОЗЧИНИ

- 1 Кофеїновий реактив: наважки 2,5 г кофеїну, 3,75 г бензойнокислого натрію, 3,76 г безводного оцтовокислого натрію, взяті з точністю 0,005 г, кількісно перенести у колбу з широким отвором або склянку місткістю 50-100 мл, розчинити в 16-17 мл дистильованої води на водяній бані при температурі 50-60° С. Розчин кількісно перенести в мірну колбу місткістю

- 50 мл, охолодити і довести до мітки дистильованою водою, перемішати, профільтрувати через фільтрувальний папір. Термін зберігання 2 тижні.
2. Діазореактив I: наважку сульфанілової кислоти 0,5 г, зважену з точністю 0,005 г, кількісно перенести в мірну колбу місткістю 100 мл, долити 30 мл дистильованої води, 1,5 мл соляної кислоти та розчинити при нагріванні. Перемішати та охолодити розчин, довести дистильованою водою до мітки. Реактив стійкий, зберігати в посуді з темного скла.
3. Діазореактив II: наважку азотисто-кислого натрію 0,5 г, взяту з точністю 0,005 г, розчинити в 99,5 мл дистильованої води. Термін зберігання 2-3 тижні.
4. Діазосуміш: Змішати 10 мл діазореактиву I і 0,3 мл діазореактиву II. Готувати перед використанням.
5. 0,15 М розчин хлористого натрію: наважку хлориду натрію 8,775 г, взяту з точністю 0,005 г, кількісно перенести у мірну колбу місткістю 100 мл, розчинити в дистильованій воді, об'єм довести до мітки, перемішати. Зберігати у холодильнику при температурі + 4° С.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. Визначення прямого білірубіну:

- 1.1. У пробірки "дослід" та "контроль" внести 0,1 мл негемолізованого сироватки.
- 1.2. У всі пробірки прилити 0,35 мл розчину хлориду натрію.
- 1.3. У пробірки "дослід" прилити 0,05 мл діазосуміші, у пробірки "контроль" – 0,05 мл дистильованої води.
- 1.4. Через 5 хв після додавання діазосуміші проби "дослід" та "контроль" колориметрувати на МКМФ-1 при довжині хвилі 515 нм у кюветі 5 мм проти дистильованої води. (Зручно зробити так: додати діазосуміш у перші проби, колориметрувати проби, потім додати діазосуміш у наступні проби і т.д.). Якщо проба "дослід" стоїть довше то забарвлення посилюється так як в реакцію вступає непрямий білірубін. Проби мають блідо-жовте забарвлення.
- 1.5. Від показника екстинкції проби "дослід" відняти показник екстинкції відповідної проби "контроль" та по калібрувальній кривій визначити концентрацію прямого білірубіну.

2. Визначення загального білірубіну.

- 2.1. У пробірки "дослід" та "контроль" внести 0,1 мл негемолізованого сироватки.
- 2.2. У всі пробірки прилити 0,35 мл кофеїнового реактиву.
- 2.3. У проби "дослід" прилити 0,05 мл діазосуміші, у проби "контроль" – 0,05 мл дистильованої води.
- 2.4. Через 20 хв після додавання діазосуміші проби "дослід" та "контроль" колориметрувати на МКМФ-1 при довжині хвилі 515 нм у кюветі 5 мм

дистильованої води. Якщо проба стоїть довше, то інтенсивність забарвлення зменшується. Проби мають рожево-жовте забарвлення.

По показника екстинкції проби "дослід" відняти показник екстинкції порівняльної проби "контроль" та по калібрувальній кривій визначити концентрацію загального білірубину.

Визначення непрямого білірубину.

По показника концентрації загального білірубину відняти показник концентрації прямого білірубину. Звичайно 75 % приходиться на долю прямого білірубину.

ПОБУДОВА КАЛІБРУВАЛЬНОГО ГРАФІКУ.

НАБОР «БІЛІРУБІН-ЕТАЛОН» ФІРМИ «ЛАХЕМА» ЧЕХІЯ.)

Приготувати розчин білірубину концентрацією "а" мкмоль/л. (Значення "а" вказано на етикетці флакону "білірубін"): у флакон внести точно 4 мл дистильованої води, розчинити вміст флакону при перемішуванні. Розчин стійкий 3 доби при температурі 5°C в темряві.

Приготувати розчин альбуміну для розбавлення концентрації 20 г/л: у флакон "альбумін" внести точно 8 мл дистильованої води, розчинити вміст флакону при перемішуванні. Розчин стійкий мінімально 1 тиждень при 5°C в темряві.

Приготувати калібрувальні розчини згідно таблиці.

№ розчину	Розчин білірубину, мл	Розчин альбуміну, мл	Кінцева концентрація білірубину, мкмоль/л
1	0,10	1,90	0,05 • а
2	0,25	1,75	0,125 • а
3	0,50	1,50	0,250 • а
4	0,75	1,25	0,375 • а
5	1,00	1,00	0,500 • а

а) 0,1 мл кожного калібрувального розчину внести у відповідну пробірку, пробірку "контроль на реактиви" 0,1 мл дистильованої води;

б) у всі пробірки прилити 0,35 мл кофеїнового реактиву та 0,05 мл соку м'якоти, перемішати.

в) через 20 хв проби колориметрувати проти "контролю на реактиви" на МКМФ-1 при довжині хвилі 515 нм у кюветі 5 мм.

Побудувати графік залежності концентрації білірубину (С) від екстинкції (Е).

При прямій пропорціональній залежності концентрації від екстинкції врахувати коефіцієнт пропорціональності К.

$$K = \frac{C_{\text{раф}}}{E_{\text{граф}}}$$

Розрахунок

Концентрація білірубину у дослідній пробі ($C_{\text{досл}}$) розрахувати формулою: $C_{\text{досл}} = K \cdot (E_{\text{досл}} - E_{\text{корекція}})$ мкмоль/л.

Нормальні величини:

білірубін загальний 8,5 - 20,5 мкмоль/л

білірубін прямий 0 - 5,1 мкмоль/л

білірубін непрямий - звичайно 75% від загального білірубину.

Примітка. Сироватка не повинна бути гемолізованою!

Література: Лабораторные методы исследования в клинике / Под ред. Меньшикова В.В. - М.: Медицина, 1987. - 364 с.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ КАТАЛАЗИ В КРОВІ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Про активність каталази судять за кількістю пероксиду водню, що розклався під дією ферменту, який міститься в пробі крові. Кількість пероксиду водню визначають титруванням розчином перманганату калію в кислому середовищі.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Дозатор автоматичний поршневий медичний А-2, ТУ 64-1-2828-81
2. Дозатори піпеткові П1-0,02, П1-1,0, ТУ 64-1-3329-81
3. Колориметр фотоелектричний концентраційний КФК-2-УХЛ 4.2, ТУ 3.1766-82
4. Терези електронні ВЛ Е-134, ГОСТ 24104-88
5. Бюретка місткістю 25 мл, ГОСТ 20292-74
6. Бюретка місткістю 100 мл, ГОСТ 20292-74
7. Колба мірна місткістю 1000 мл, ГОСТ 1770-74
8. Колба хімічна термостійка місткістю 200 мл, ГОСТ 1770-74
9. Піпетка скляна градуйована місткістю 2 мл, 2-й клас, ГОСТ 20292-74
10. Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74
11. Пробірки хімічні 20x200, ГОСТ 25336-82
12. Стаканчики хімічні місткістю 50 мл, ГОСТ 1770-74
13. Холодильник побутовий, ТУ 84-89
14. Циліндри мірні місткістю 50, 100, 500 мл, ГОСТ 1770-74
15. Штативи для пробірок поліетиленові ШПП 02-40 ТУ 64-1-2669-83
16. Штативи круглі металічні для пробірок $d = 20$ мм ТУ 64-1-359-79

РЕАКТИВИ

1. Водню пероксид, кваліфікація «чда» ГОСТ 10929-76
2. Калію перманганат, стандарт-титри 0,1 н ТУ 6-09-2540-87

- 1. Кислота сірчана концентрована, кваліфікація «чда» ГОСТ 4204-77
- 2. Натрію хлорид, кваліфікація «чда» ТУ 6-09-5222-85

РОЗЧИНИ

- 1. Розчин пероксиду водню, концентрація 1%: 1 мл пероксиду водню концентрації 33%, відміреного скляною піпеткою місткістю 2 мл з точністю до 0,01 мл, змішати з 32 мл дистильованої води, відміреної з точністю до 0,1 мл мірним циліндром місткістю 50 мл. Розчин зберігання не підлягає, готувати безпосередньо перед проведенням аналізу;
- 2. Розчин перманганату калію, концентрація 0,1 н. Готувати з стандарт-титрів в мірну колбу місткістю 1000 мл перенести (дуже обережно, не допускаючи розбрикування розчину!) перманганат калію із ампули стандарт-титрів. Ампулу добре промити дистильованою водою, збираючи промиті води в мірну колбу. Розчин у колбі перемішувати до повного розчинення кристалів перманганату, долити розчин дистильованою водою до мітки на колбі та добре перемішати. Розчин зберігати у склянці темного скла з притертою пробкою при кімнатній температурі протягом 2-х тижнів;
- 3. Розчин сірчаної кислоти, концентрація 10%: в колбу з термостійкого скла долити 450 мл дистильованої води, відміреної мірним циліндром місткістю 500 мл з точністю до 1 мл, та додати туди обережно, по краплях, весь час перемішуючи розчин, 28,5 мл концентрованої сірчаної кислоти, відміреної мірним циліндром місткістю 50 мл з точністю до 0,5 мл. Після охолодження розчин перенести в склянку з притертою пробкою. Розчин стійкий;
- 4. Розчин хлориду натрію, концентрація 3% (мас.): на терезах зважити 3 г хлориду натрію з точністю до 0,01 г, перенести в хімічну колбу місткістю 100 мл та налити в цю ж колбу 97 мл дистильованої води, відміреної з точністю до 1 мл; добре перемішати до повного розчинення хлориду натрію. Розчин зберігати у холодильнику при температурі +4 - +8°С протягом 2-х тижнів.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

- 1. В штатив круглий металевий поставити хімічні пробірки за числом проб крові, що аналізуються.
- 2. В штатив поліетиленовий поставити пробірки центрифужні також за числом проб крові та ще одну для контролю на реактиви.
- 3. Усі пробірки в двох штативах підписати номерами, що відповідають номеру проби крові.
- 4. В хімічні пробірки налити за допомогою дозатора автоматичного А-2 40 мл дистильованої води.
- 5. В центрифужні пробірки налити за допомогою дозатора автоматичного А-2 4 мл розчину хлориду натрію.

6. В усі пробірки (крім контролю) додати за допомогою дозатора піпеткового 0,02 мл крові та добре перемішати.
7. Визначити оптичну густину суміші, що міститься в центрифужних пробірках, на КФК-2, або КФК-2МП в кюветі з довжиною оптичного шляху 3 мм при довжині хвилі 670 нм (червоний світлофільтр) при контролі на реактиви (розчин хлориду натрію).
8. Кількість еритроцитів в 1 мл крові визначити за формулою:

$$K = 4,875 \times E,$$

де E - оптична густина проби.

9. В хімічні стаканчики місткістю 50 мл налити 7 мл дистильованої води за допомогою дозатора автоматичного А-2 та пронумерувати номерами відповідно номеру проб крові; два стаканчика взяти номерів для контролю.

10. В ці ж стаканчики додати 1 мл розчину крові з хімічної пробірки відміреного з точністю до 0,1 мл за допомогою скляної піпетки місткістю 1 мл, та 2 мл 1%-ного розчину пероксиду водню, відміреного з точністю до 0,1 мл за допомогою скляної піпетки місткістю 2 мл. В контрольні стаканчики додавати лише розчин пероксиду водню.

11. Залишити стаканчики з розчином на 30 хв при кімнатній температурі при періодичному перемішуванні.

12. Рівно через 30 хв додати у кожний стаканчик (у проби і в контрольні) 10%-ного розчину сірчаної кислоти, відміреного з точністю до 0,2 мл за допомогою бюретки місткістю 100 мл.

13. Титрувати розчином перманганату калію до появи рожевого забарвлення.

14. Активність каталази обчислювати за формулою:

$$KI = (V_{к(К Mn O_4)} - V_{п(К Mn O_4)}) \times 1,7, \text{ де:}$$

KI - каталазний індекс;

$V_{к(К Mn O_4)}$ - об'єм 0,1 н розчину перманганату калію, витраченого при титруванні контролю, мл;

$V_{п(К Mn O_4)}$ - об'єм 0,1 н розчину перманганату калію, витраченого при титруванні проби, мл;

1,7 - коефіцієнт.

$$KP = KI / K, \text{ де:}$$

KP - показник каталази, у.о.;

K - кількість еритроцитів в 1 мл крові.

Нормальні показники: $3,03 \pm 0,14$ у.о.

Література: Методы исследования в профпатологии (биохимические). Под ред. О.Г. Архиповой. М.: Медицина. - 1988. - С. 156-157.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ЦЕРУЛОПЛАЗМІНУ У СИРОВАТЦІ КРОВІ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Визначення концентрації церулоплазміну в сироватці ґрунтоване на реакції окиснення п-фенілендіаміну, яке відбувається при участі церулоплазміну. Ферментативна реакція зупиняється додаванням кристального натрію. За оптичною густиною продуктів, що утворюються, визначають концентрацію церулоплазміну у дослідній пробі.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Аналізатор автоматичний поршневий медичний А-2, ТУ 64-1-2828-81
2. Лабораторні піпеткові ПІ-0,02, ПІ-1,0, ТУ 64-1-3329-81
3. Колориметр фотоелектричний концентраційний КФК-2- УХЛ 4.2. ТУ 11766-82
4. Терези електронні ВЛ Е- 134, ГОСТ 24104-88
5. Терези торсіонні ВТ-500, ТУ 64-1-990-81
6. рН-метр- мілівольтметр, тип рН-150, ГОСТ 22261-82
7. Колба мірна місткістю 250, 1000 мл, ГОСТ 1770-74
8. Колби хімічні місткістю 100, 500 мл, ГОСТ 1770-74
9. Піпетка скляна градуйована місткістю 2 мл, ГОСТ 1770-74
10. Пробірки хімічні, ГОСТ 25336-82
11. Термостат ТС-80 М, ТУ 64-1-1382-83
12. Холодильник побутовий, ТУ 84-89
13. Циліндри мірні місткістю 100, 500 мл, ГОСТ 1770-74
14. Штативи поліетиленові для пробірок ШПІ 02-40, ТУ 64-1-2669-83

РЕАКТИВИ

1. Кислота оцтова льодяна, кваліфікація «хч» ГОСТ 61-75
2. Натрію ацетат трьохводний, кваліфікація «чда» ГОСТ 199-78
3. Натрію фторид, кваліфікація «чда» ГОСТ 4463-76
4. Натрію хлорид, кваліфікація «чда» ГОСТ 4233-77
5. п-фенілендіамін дигідрохлорид, кваліфікація «чда» ТУ 6-09-07-1628-87

РОЗЧИНИ

1. Ацетатний буферний розчин, рН 5,5: в мірну колбу місткістю 1000 мл, в яку налити близько 500 мл дистильованої води, перенести 54,42 г ацетату натрію трьохводного, зваженого на терезах з точністю до 0,01 г, та перемішати до повного розчинення ацетату натрію. Прилити 2,36 мл льодяної оцтової кислоти, ретельно перемішати, долити дистильовану воду майже до мітки на

мірній колбі та знов ретельно перемішати. Залишити розчин при кімнатній температурі на одну годину. Через одну годину перевірити рН розчину. В необхідності довести рН до значення 5,5, додаючи натрію ацетат, якщо рН менше 5,5, або льодяну оцтову кислоту, якщо рН більше 5,5. Розчин зберігати в холодильнику при температурі $+8 - +10^{\circ}\text{C}$ протягом 1 місяця.

2. Розчин п-фенілендіаміну дигідрохлориду, концентрація 0,5% (мас. об'єм): в мірну колбу місткістю 100 мл перенести 0,5 г п-фенілендіаміну дигідрохлориду, зваженого на торсіонних терезах з точністю до 0,01 г, налити близько 90 мл дистильованої води, перемішати до повного розчинення реактиву, довести розчин дистильованою водою до мітки в мірній колбі та знов ретельно перемішати. Розчин зберігати не підлягає.

3. Розчин фториду натрію, концентрація 3%: в хімічну колбу місткістю 500 мл налити 485 мл дистильованої води, відміреної за допомогою мірного циліндра з точністю до 1 мл, та підігрітої приблизно до 70°C , перенести цю колбу 15,0 г фториду натрію, зваженого на терезах з точністю до 0,01 г, та перемішати до повного розчинення фториду натрію. Розчин зберігати при кімнатній температурі протягом 1 місяця.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. В поліетиленовий штатив для пробірок помістити хімічні пробірки відповідної кількості, яка відповідає кількості проб, що аналізуються.

2. За допомогою піпеткового дозатора в пробірки внести 0,1 мл сироватки без слідів гемолізу.

3. За допомогою автоматичного дозатора налити в кожен пробірку 8 мл ацетатного буферного розчину.

4. Піпетковим дозатором внести в пробірки 1 мл розчину п-фенілендіаміну дихлориду; ретельно перемішати вміст пробірок.

5. В пробірку для контрольного розчину за допомогою дозатора або автоматичного дозатора внести 8 мл ацетатного буферного розчину, 2 мл розчину фториду натрію, відміреного за допомогою скляної піпетки з точністю до 0,1 мл та 1 мл розчину п-фенілендіаміну дихлориду, відміреного за допомогою скляної піпетки з точністю до 0,1 мл, ретельно перемішати.

6. Всі пробірки поставити в термостат і витримати при температурі 37°C протягом 1 години.

7. Додати в усі пробірки, крім пробірки з контрольним розчином, 2 мл розчину фториду натрію, відміреного за допомогою скляної піпетки з точністю до 0,1 мл.

8. Всі проби помістити в холодильник і витримати при температурі $+4 - +8^{\circ}\text{C}$ протягом 30 хв.

9. Виміряти оптичну густину розчинів на КФК-2МП або на КФК-2 в кюветі з довжиною оптичного шляху 10 мм при довжині хвилі 540 нм (зелений світлофільтр) проти контрольного розчину.

Концентрацію церулоплазміну в сироватці крові обчислювати за формулою:

$$C = E \times 875,$$

де C – концентрація церулоплазміну в дослідній сироватці, мг/л;
 E – врахунковий коефіцієнт.

Порядкові величини: Концентрація церулоплазміну в сироватці крові здорових людей складає $224,52 \pm 11,67$ мг/л.

Література: Колб В.Г., Калашников В.С. Клиническая биохимия. – Минск: Беларусь, 1976. – С. 219 – 220.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОГО ХОЛЕСТЕРИНУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ПРЯМИМ МЕТОДОМ (ПО ІЛЬКУ)

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Холестерин в присутності оцтового ангідриду та суміші оцтової і соляної кислот дає зелене забарвлення.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

Спектрометр фотоелектричний концентраційний КФК-2-УХЛ 4.2, ТУ 3-1766-82

Інтер'єр піпетковий ПІ-0,1, ТУ 64-1-3329-81

Піпетка скляна місткістю 5 мл, ГОСТ 1770-74

Термостат ТС-80М, ТУ 64-1-1382-83

Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74

Конідрі мірні місткістю 50, 100, 500 мл, ГОСТ 1770-74

Хімічна колба місткістю 250 мл, ГОСТ 1770-74

Штагиви поліетиленові для пробірок ШПП 02-40 ТУ 64-1-2669-83

Ваги електронні ВЛ Е-134, ГОСТ 104-88

Секундомір тип СОСпр.-26-2-000, ТУ 23-1894. 003-90

Сухожарова шафа, В-151 ТЧ 64-1-1111-72

Холодильник побутовий, ТУ 84-89

РЕАКТИВИ

Людзяна оцтова кислота (ЛОК), кваліфікація “хч” ГОСТ 61-75

Кислота сірчана концентрована, кваліфікація “чда” ГОСТ 4204-77

Оцтовий ангідрид, кваліфікація “чда”, ГОСТ 5815-77

Спирт етиловий 96°, ГОСТ 5962-67

Хлороформ, кваліфікація “ч” ТУ 6-09-800-76

Мідь сірчаноокисла п'ятиводна, кваліфікація “чда”, ГОСТ 4165-88

Стандарт холестерину, (“Реагент”, м. Дніпропетровськ, Україна)

РОЗЧИНИ

1. Реактив Ілька (одна частина ЛОК, п'ять частин оцтового ангідриду та одна частина концентрованої сірчаної кислоти): змішати оцтову кислоту з оцтовим ангідридом у термостійкій колбі або стакані та помістити її у холодну воду з льодом та повільно, краще по краплях додавати сірчану кислоту при постійному перемішуванні. Не допускати нагріву суміші. Реактив повинен бути без кольору, або з ледве помітним жовтуватим відтінком. Готовий реактив перелити в посуд з темного скла з притертою пробкою. Термін зберігання необмежений. Зберігати при температурі + 4°C у темряві.
2. Стандартний розчин холестерину, 4,655 ммоль/л (1,8 мг/мл): навесу холестерину, взяту з точністю 0,00001 г, розчинити 2,5 мл хлороформу та кількісно перенести у мірну колбу місткістю 100 мл довести об'єм до мірки абсолютним спиртом, перемішати. Після приготування розчин перелити в посуд з темного скла, пробку герметизувати парафіном. Зберігати у холодильнику.
3. Абсолютний спирт: мідь сірчаної кислоти п'ятиводну просушити при температурі 120°C у сухожаровій шафі (до блідоблакитного кольору). Насипати у чисту скляну пляшку з притертою пробкою, налити 96° спирту (приблизно 10 г міді сірчаної кислоти на 100 мл 96° спирту). Залишити на 1-2 діб при періодичному перемішуванні. По мірі поглинання води спирту порошок надобуває сине забарвлення. Спирт перелити у другу пляшку, яка містить свіжу порцію обезводженої міді сірчаної кислоти та процедуру повторити до тих пір, поки осад не перестане набувати голубого кольору. Обезводнений спирт злити та відфільтрувати у чистий посуд, який щільно закривають.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

У хімічні пробірки "дослід" та "контроль" налити по 2,1 мл реактиву Ілька.

У пробірку "дослід" прилити 0,1 мл негемолізованої сироватки так, щоб вона повільно стікала по стінкам пробірки. У пробірку "контроль" прилити 0,01 мл дистильованої води. Енергійно струхити 10-12 разів.

Пробірки накрити скляними кришками і витримати у темряві при температурі 37°C протягом 20 хв. Охолодити водопрвідною водою.

Проби "дослід" фотометрувати в кюветі з товщиною шару 5 мм (1 см) при довжині хвилі 630-690 нм (червоний світлофільтр) проти пробірки "контроль".

Розрахунок вести по калібрувальному графіку.

Побудова калібрувального графіку

Підготувати калібрувальні проби згідно таблиці.

Таблиця

№ калібрувальної проби	Об'єм стандартного розчину, мл	Об'єм реактиву Ілька, мл	Концентрація холестерину у сироватці, ммоль/л
1	0,05	2,15	2,33
2	0,10	2,10	4,65
3	0,15	2,05	6,98
4	0,20	2,00	9,31
5	0,25	1,95	11,64

Калібрувальні проби обробити як дослідні.

Побудувати графік у координатах: концентрація холестерину (С) – екстинкція

При прямій пропорціональній залежності розрахувати коефіцієнт К.

$$K = \frac{C_{\text{середня}} \text{ ммоль/л}}{E_{\text{середня}}}$$

Визначити концентрації холестерину в пробі "дослід", визначити за формулою:

$$C_{\text{дослід}} = K \cdot E_{\text{дослід}} \text{ ммоль/л}$$

Параметричні величини: кількість загального холестерину в сироватці не повинається від 3 до 6,2 ммоль/л.

Примітка: реакцію необхідно проводити в абсолютно чистих та сухих пробірках, користуватись абсолютно чистими та сухими піпетками.

Література: Лабораторные методы исследования в клинике / Под ред. Гинзбург В.В. - М.: Медицина, 1987. - 364 с.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ

АКТИВНОСТІ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ В КРОВІ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Аспіралін здатний до реакції автоокиснення у лужному середовищі з генерацією супероксиданіонрадикалу, причому ця реакція протікає з певною швидкістю (V_1). У присутності супероксиддисмутази ця швидкість зменшується до деякого значення (V_2), що залежить від активності супероксиддисмутази. Порівняння швидкостей V_1 та V_2 дає змогу судити про активність супероксиддисмутази у дослідному зразку біоматеріалу.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

Дозатори піпеткові ПІ-0,1, ПІ-0,5, ТУ 64-1-3329-81

Спектрофотометр фотоелектричний концентраційний КФК-2-УХЛ 4.2. ТУ

1766-82

3. Секундомір тип СОС пр.-26-2-000, ТУ 23-1894
4. Терези торсіонні ВТ-500, ТУ 64-1-990-81
5. Терези електронні ВЛ Е-134, ГОСТ 24104-88
6. рН - метр- мілівольтметр, тип рН-150, ГОСТ 22261-82
7. Колба мірна місткістю 1000 мл, ГОСТ 1770-74
8. Колби хімічні місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74
9. Піпетки скляні градуйовані місткістю 2, 5 мл, 2-й клас, ГОСТ 2029
10. Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74
11. Плита електрична з зак. Сп. ЕПШ-1-0,8, ГОСТ 14919-83
12. Термостат біологічний, діапазон температур 22-35°С, ТУ 2.998
13. Холодильник побутовий, ТУ 84-89
14. Циліндр мірний місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74
15. Центрифуга лабораторна ОПН-3 УХЛ 4.2, ТУ 5.375-4260-76
16. Штативи для пробірок поліетиленові ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669

РЕАКТИВИ

1. Адреналіну гідротартрат, ("Sigma", США)
2. Кислота лимонна, кваліфікація «чда», ГОСТ 3652-69
3. Натрію гідрокарбонат, кваліфікація «чда», ГОСТ 4201-79
4. Натрію карбонат десятиводний, кваліфікація «чда», ГОСТ 84-76
5. Натрію карбонат зневоднений, кваліфікація «чда», ГОСТ 83-79
6. Спирт етиловий 96°, ГОСТ 5962-67
7. Хлороформ, кваліфікація «чда», ГОСТ 20015-74

РОЗЧИНИ

1. Буферна суміш рН 10,2: в мірну колбу місткістю 1000 мл необхідно перенести 4,5 г гідрокарбонату натрію, зваженого на терезах з точністю до 0,01 г, та розчинити його в невеликій кількості дистильованої води, 3,5 г карбонату натрію зневодненого (або 9,5 г карбонату натрію десятиводного зваженого на терезах з точністю до 0,1 г, перемішати та долити дистильовану воду майже до мітки на мірній колбі. Перевірити рН суміші і в разі необхідності довести рН до значення 10,2, додаючи обережно невеликі порціями гідрокарбонат натрію, якщо рН більше 10,2, або карбонат натрію якщо рН менше 10,2. Суміш зберігати в холодильнику в скляній з притертою пробкою при температурі +8 - +10 °С протягом 2-х тижнів.
2. Робочий розчин адреналіну. В хімічну колбу місткістю 100 мл налити 80 мл дистильованої води, відміреної циліндром місткістю 100 мл з точністю до 1 мл, та перенести в неї 0,192 г лимонної кислоти зваженого на торсіонних терезах з точністю до 0,001г, та добре перемішати. В розчин лимонної кислоти перенести 0,333 г адреналіну гідротартрату, зваженого на торсіонних терезах з точністю до 0,001г, добре перемішати. Розчин адреналіну зберігати в холодильнику при температурі +8 - +10 °С протягом 2-х тижнів.

Відколювач гемоглобіну. В хімічну колбу місткістю 100 мл перенести 10 мл спирту 96°, відміреного за допомогою циліндра місткістю 100 мл з точністю до 1 мл та 30 мл хлороформу, відміреного за допомогою того ж циліндра, добре перемішати. Розчин зберігати протягом двох тижнів у банці темного скла з притертою пробкою.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

В обнесиленовий штатив для пробірок поставити центрифужні пробірки в кількості, що дорівнює кількості проб крові та підписати їх відповідними номерами.

За допомогою дозатора піпеткового місткістю 0,5 мл налити в кожну пробірку 0,5 мл дистильованої води та 0,5 мл крові. Пробірки повинні постояти при кімнатній температурі 10-15 хв для утворення гемолізату.

В кожну пробірку за допомогою скляної піпетки місткістю 2 мл налити 2 мл розчину, що осаджує гемоглобін, та добре перемішати скляною паличкою.

Пробірки закрити гумовими пробками та поставити в холодильник. Проби вивернути при температурі -4°C не менше доби.

За добу проби добре розмішати скляною паличкою та центрифугувати (3000 об/хв) протягом 15 хв.

Вивернути швидкість окислення адреналіну. Для цього в кювету для оптичних вимірювань з довжиною оптичного шляху 10 мм налити 4,4 мл буферної суміші, опітної скляною піпеткою, 0,1 мл дистильованої води, відміреної дозатором піпетковим, встановити цю кювету в кюветоутримувач колориметра фотоелектричного КФК-2. Виставити на приладі «0» оптичної густини.

Примітка: Буфер під час дослідження знаходиться в термостаті при температурі 26°C .

Після цього додати за допомогою дозатора піпеткового місткістю 0,5 мл робочого розчину адреналіну і включити секундомір. Розчин перемішати пластиковою паличкою і вимірювати оптичну густину його через кожну хву протягом всього часу, коли спостерігається її зростання.

Визначити швидкість окислення адреналіну у присутності проби, що містить супероксиддисмутазу. Для цього в кювету налити 4,4 мл буферної суміші, 0,5 мл проби, взятої з верхнього шару центрифугата, встановити цю кювету в кюветоутримувач колориметра фотоелектричного і діяти далі за п. 6.

Активність супероксиддисмутазу обчислювати за формулою:

$$T = \frac{(\Delta E_{\text{к}} / t - \Delta E_{\text{д}} / t)}{\Delta E_{\text{д}} / t} \times 100,$$

Т - процент гальмування реакції автоокиснення адреналіну, %;

$\Delta E_{\text{д}} / t$ - найбільша швидкість автоокислення адреналіну;

$\Delta E_{\text{к}} / t$ - найбільша швидкість автоокислення адреналіну у присутності проби, що містить супероксиддисмутазу.

$$A_c = T/(100-T),$$

де: A_c - активність супероксиддисмутази в умовних одиницях.

- Примітки:** 1. 1 одиниця вказує на гальмування швидкості реакції на 50%
2. Активність супероксиддисмутази залежить від температури, тому визначення необхідно проводити при температурі 26°C.

Нормальні величини: 0,94 ± 0,034 од.

Література: Брусов О.С., Герасимов А.М., Панченко Л.Ф. Влияние природных ингибиторов радикальных реакций на автоокисление адреналина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 1976. - № 1. - С. 31-33

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ДІЄНОВИХ КОН'ЮГАТІВ У СИРОВАТЦІ КРОВІ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Визначення концентрації дієнових кон'югатів базується на властивості поглинати світлове випромінювання в ультрафіолетовому відрідку спектра. Максимум поглинання спостерігається при довжині хвилі 232 нм. При цьому оптична густина розчину пропорційна концентрації дієнових кон'югатів в дослідній сироватці.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Спектрофотометр СФ-46 (Ломо, Росія), ТУ 3.-3. 1841-84
2. Терези електронні ВЛ Е-134, ГОСТ 24104-88
3. Колба мірна місткістю 1000 мл, ГОСТ 1770-74
4. Піпетки скляні градуйовані місткістю 2, 10 мл ГОСТ 1770-74
5. Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74
6. Центрифуга лабораторна ОПН-3 УХЛ 4.2 ТУ 5.375-4260-76
7. Штативи поліетиленові для пробірок ШПІ 02-40, ТУ 64-1-2669-83

РЕАКТИВИ

Натрію хлорид, кваліфікація «чда» ТУ 6-09-5222-85;

РОЗЧИНИ

Розчин хлориду натрію, концентрація 5%: в хімічну колбу місткістю 1000 мл перенести 50,0 г хлориду натрію, зваженого на терезах з точністю до 0,1 г. додати 950 мл дистильованої води, відміреної циліндром з точністю до 1 мл. та добре перемішати. Розчин зберігати в холодильнику при температурі +8 - +10°C протягом 1 місяця.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. Після визначення концентрації β-ліпопротеїдів (див." Стандартизовані методи визначення концентрації β- та пре-β-ліпопротеїдів в сироватці

пробірки помістити в центрифугу та центрифугувати при 3000 об/хв протягом 10 хв.

Залишити центрифугат. На дні центрифужної пробірки залишається осад білого кольору.

До осадку в пробірки долити скляною піпеткою 12 мл розчину хлориду натрію.

Сумішшю перемішати розчин скляною паличкою до повного розчинення осаду.

Виміряти оптичну густину розчину на спектрофотометрі СФ-46 в довжину оптичного шляху 10 мм при довжині хвилі 232 нм для контролю. Контролем служить дистильована вода.

Концентрацію дієвих кон'югатів в дослідній сироватці обчислювати за формулою:

$$C = E/0,0132, \text{ де:}$$

C — концентрація дієвих кон'югатів у сироватці, мкМ;

E — оптична густина;

$0,0132$ — коефіцієнт, що враховує молярний коефіцієнт поглинання, об'єм розчину для аналізу проби сироватки, розбавлення проби в ході аналізу, довжину оптичного шляху.

Нормальні величини: В сироватці здорової людини концентрація дієвих кон'югатів коливається від 50 до 80 мкМ.

Література: Методы диагностики метаболических нарушений при циррозе и дифференцированное применение противогеросклеротических средств. Методические рекомендации. Воскресенский О.М., Дельва В.А. и др. — Москва, 1982. — 26 с.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ЛУЖНОЇ І КИСЛОЇ ФОСФАТАЗ В СИРОВАТЦІ КРОВІ (по гідролізу β -гліцерофосфата)

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Під дією фосфатази ферменту сироватки крові, β -гліцерофосфат натрію підлягає гідролізу з вивільненням неорганічного фосфору. По різниці між органічного та неорганічного фосфору знайти фосфор, що виділився під дією фосфатази (активність фосфатази).

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

Терези електронні ВЛ Е-134, ГОСТ 104-88

Центрифуга ОПН-ЗУХЛ4.2, ТУ 5-375-42-60-76

Термостат ТС-80 М-2, ТУ 64-1-1382-83

4. Колориметр фотоелектричний концентраційний КФК-2-УХЛ 4.2, ТУ 3. 1766-82.
5. Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74
6. Колби мірні місткістю 25, 100, 500, 1000 мл, ГОСТ 1770-74
7. Піпетки мірні місткістю 1, 10 мл, ГОСТ 20292-74
8. Дозатор піпетковий П1-0,1, П1-0,2, П1-1, ТУ 64-1-3329-81
9. рН-метр-мілівольтметр, тип рН-150, ГОСТ 22261-82

РЕАКТИВИ

1. Калій фосфорнокислий однозаміщений, кваліфікація "чда" ГОСТ 4198
2. β -гліцерофосфат натрію
3. Натрій барбітуровоокислий, (Борщагівський хімфармзавод, Україна)
4. Натрію гідроксид, кваліфікація "чда", ГОСТ 4328-77
5. Амоній молібденовоокислий, кваліфікація "хч" ГОСТ 3765-71
6. Кислота трихлороцтова (ТХО), кваліфікація "чда", ТУ 6-09-1926
7. Кислота оцтова концентрована (ЛОК), кваліфікація "хч" ГОСТ 61
8. Кислота сірчана концентрована, кваліфікація "чда" ГОСТ 4204-77
9. Кислота аскорбінова, (Київський вітамінний завод)
10. Толуол, кваліфікація "чда" ГОСТ 5989-78
11. Кислота соляна концентрована, кваліфікація "ч" ГОСТ 3118-77

РОЗЧИНИ

1. Основний стандартний розчин фосфору: 0,4389 г калію фосфорнокислого однозаміщеного, який був висушений до постійної маси при температурі 120°C , розчинити дистильованою водою в колбі місткістю 100 мл. Для консервації в приготований розчин додати декілька крапель хлороформу. 1 мл розчину отримує 1 мг фосфору.
2. Робочий стандартний розчин: Готувати перед використанням розведенням в 100 разів основного стандартного розчину фосфору. Вміст фосфору в робочому розчині - 0,01 мг/мл
3. Вихідний розчин β -гліцерофосфату: зберігати в холодильнику, темному посуді 10-15 днів. Для однієї проби необхідно 2,0 мл реактиву. 1 г натрію β -гліцерофосфату у 0,85 г барбітуровоокислого натрію (медінала) внести в мірну колбу місткістю 100 мл, прилити близько 50 мл дистильованої води, розчинити, довести до мітки, нашарувати близько 3 мл толуолу.
4. Лужний розчин β -гліцерофосфату. Для однієї проби необхідно 2,0 мл реактиву. 50 мл вихідного розчину β -гліцерофосфату помістити в колбу місткістю 100 мл, додати 2,8 мл 0,1 н розчину гідроксиду натрію і довести до мітки дистильованою водою до мітки. Нашарувати близько 3 мл толуолу. рН $8,6 \pm 0,1$. Зберігати в холодильнику протягом 10 днів.

Вічний розчин β -гліцерофосфату. Для першої проби потрібно 2,0 мл розчину. 50 мл вихідного розчину β -гліцерофосфату помістити в мірну колбу місткістю 100 мл, додати 5 мл 1 н оцтової кислоти, довести до мітки дистильованою водою. Нашарувувати 3 мл толуолу. рН розчину $5,0 \pm 0,1$. Зберігати в холодильнику.

0,1% молібденовий розчин: наважку амонію молібденовокислого масою 0,1 г зважити з точністю 0,005 г, розчинити в 95 мл дистильованої води, перемішати. Зберігати у холодильнику при $+4^{\circ}\text{C}$ протягом 1 місяця.

Розчин «А»: 5 г молібденовокислого амонію розчинити в 50 мл дистильованої води. Профільтрувати.

Розчин «Б»: До 25 мл дистильованої води прилити 14 мл сірчаної кислоти. Розчин «А» і «Б» перенести в мірну колбу на 100 мл. Охолодити.

Довести об'єм до мітки. Для однієї проби необхідно 0,8 мл розчину. Термін зберігання 1 місяць при температурі $+4^{\circ}\text{C}$.

0,1 М розчин гідроксиду натрію: наважку гідроксиду натрію 2 г зважити з точністю 0,005 г, розчинити в колбі місткістю 500 мл дистильованою водою. Розчин охолодити, довести об'єм до мітки.

0,1% розчин аскорбінової кислоти (готувати на 0,1 н розчину соляної кислоти): Наважку аскорбінової кислоти масою 1 г, зважити з точністю 0,005 г, розчинити в колбі місткістю 100 мл 0,1 н розчинном соляної кислоти, перемішати. Готувати для використання. На одну пробу необхідно 0,8 мл розчину.

0,1% розчин ТХО: наважку ТХО масою 10 г зважити з точністю 0,005 г, розчинити в 90 мл дистильованої води, перемішати. Розчин стійкий.

0,1 н соляної кислоти (готувати із стандарт-титрів): В мірну колбу місткістю 1000 мл перенести вміст ампули стандарт-титра соляної кислоти (1 н). Ампулу добре промити дистильованою водою, збираючи промивні води в мірну колбу. Вміст колби перемішати, долити розчин дистильованою водою до мітки на колбі та ще раз добре перемішати. Розчин стійкий, зберігати у склянці з притертою пробкою при кімнатній температурі.

1 н розчин і н розчин оцтової кислоти (готувати із стандарт-титрів): В мірну колбу місткістю 100 мл перенести вміст ампули стандарт-титра оцтової кислоти (1 н). Ампулу добре промити дистильованою водою, збираючи промивні води в мірну колбу. Вміст колби перемішати, долити розчин дистильованою водою до мітки на колбі та ще раз добре перемішати. Розчин стійкий, зберігати у склянці з притертою пробкою при кімнатній температурі.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

Визначення проводити в присутності буфера:

рН 8,4-10,0 - для лужної фосфатази

рН 4,5-5,0 - для кислій фосфатази

Аналіз проводити не пізніше 24 годин після взяття крові. Кров брати вранці натщесерце. За декілька днів припинити вживання сульфаніламідів і антибіотиків.

1. Для кожної проби приготувати 3 центрифужні пробірки на лужний фосфатазу, 3 - на кислу.

1-а пробірка - сумарне визначення преформованого неорганічного фосфору

2-а - неорганічного фосфору

3-я - контрольна (К)

2. В пробірки прилити:

Реагенти, мл	Пробірка №		
	1	2	3(К)
Гліцерофосфатний буфер (лужний або кислий)	5	5	5
Сироватка	0,5	0,5	--
Дистильована вода	--	--	0,5

3. 1-у і 3-ю пробірки інкубувати на протязі 1 год при 37° С.

4. В усі пробірки прилити 4,5 мл 10 % ТХО.

5. Центрифугувати 10 хв при 3000 об/хв.

6. В три чисті (краще довгі) пробірки налити по 5 мл центрифугату.

7. Додати по 1 мл молібденовокислого амонію. Перемішати.

8. Додати по 1 мл аскорбінової кислоти. Перемішати.

9. Витримувати 20 хв при кімнатній температурі.

10. Виміряти екстинкцію проб 1 та 2 проти контролю при 670 нм мікрокуветі 10 мм.

11. Визначити кількість фосфору (P_1 і P_2) у пробах 1 та 2 за калібрувальним графіком.

Калібрувальний графік:

1. Приготувати робочий стандартний розчин шляхом розчинення основного стандартного розчину в 100 разів. Вміст фосфору в робочому стандартному розчині 0,01 мг/мл.

2. Приготувати ряд розчинів згідно таблиці. Для кожного розведення приготувати свій контроль на реактиви. В контроль замість робочого стандартного розчину прилити дистильовану воду.

Таблиця

№ пробірки	Робочий стандартний розчин, мл	10 % ТХО, мл	Розчин молібденовокислого амонію, мл	Розчин аскорбінової кислоти, мл	Дист. вода, мл	Вміст фосфору пробірки
1	0,5	2,5	1,0	1,0	3,0	0,005
2	1,0	2,5	1,0	1,0	2,5	0,010
3	1,5	2,5	1,0	1,0	2,0	0,015
4	2,0	2,5	1,0	1,0	1,5	0,020
5	3,0	2,5	1,0	1,0	0,5	0,030
6	4,0	2,5	1,0	1,0	0,0	0,040

- Відтримувати 20 хв при кімнатній температурі
- Визначити екстинкцію при довжині хвилі 670 нм в мікрокуветі (як і зразку) 10 мм проти свого контролю.
- Визбудувати залежність: екстинкція - вміст фосфору.

Розрахунок

Активність фосфору визначається у мг неорганічного фосфору, що вивільняється під дією фосфатази, яка знаходиться у 100 мл сироватки за 1 годину.

Активність = $(P_1 - P_2) \times 200$ мг/год. 100 мл (одиниці Боданського Б. Е), де P_1 , P_2 - приріст фосфору за одну годину під дією фосфатази, яка знаходиться в 0,5 мл сироватки.

Коефіцієнт перерахунку на 100 мл сироватки.

Література: 1. Тодоров И. Клинические лабораторные исследования в биохимии, 1963.-478, - 2. Инструкция к набору реактивов для определения активности щелочной и кислой фосфатаз в сыворотке крови по методу Боданского.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ГЛЮКОЗИ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ФЕРМЕНТАТИВНО (набір Біо - Lachema - Тест, Чехія)

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Глюкоза окислюється киснем при катаболічній дії ферменту глюкозооксидази з утворенням перекису водню та глюконату. Перекис водню, що виділився, окислюється за реакцією окислювального азосполучення похідного фенолу з 4-гідроксиазоназом, що каталізується пероксидазою.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

- Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74
- Шпетки скляні місткістю 1, 2, 5, 10 мл, ГОСТ 20292-74
- Кювета мірна місткістю 25, 50 мл, ГОСТ 1770-74
- Дозатор піпетковий П1-0,01, ТУ 64-1-3329-81
- Терези електронні ВЛ Е-134, ГОСТ 24101-88
- Мікроколориметр медичний фотоелектричний концентраційний МКМФ-1, ТУ 64-1-3445-90
- рН-метр-мілівольтметр, тип рН-150, ГОСТ 22261-82

РЕАКТИВИ (З НАБОРУ)

- Розчин глюкози 25 ммоль/л
- Концентрований депротейніруючий реактив: ацетат уранілу 0,02 ммоль/л
- Розчин хлорид 0,82 моль/л
- Буферний розчин: трис-(оксиметил)амінометан 0,91 моль/л, рН 8,3

4. Суміш ферментів: глюкооксидаза 33,3 мккат; пероксидаза 8,3 мккат; 4-амінофеназон 0,34 ммоль; натрію сірчанокислий до 0,22 г
5. Хромоген: 4-хлор-метилфенол 0,3 ммоль з Словасолом 0 та натрію сірчанокислим.

РОЗЧИНИ

1. Стандартний розчин глюкози. Виготовляти кожного дня змішуванням 2,00 мл реактиву 1 з 3 мл дистильованої води. Вміст глюкози 10 ммоль/л.
2. Глюкозовий реактив. (Стійкий 1 тиждень в темному місці при температурі 5°C). Вміст флаконів 3,4,5 послідовно розчиняти в 100 мл дистильованої води та розбавляти до 500 мл, перемішати. Розчин містить глюкооксидазу.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. Приготувати центрифужні пробірки по кількості проб – “дослід”, “стандарт”, “контроль”.
2. Додати наступну кількість реактивів:

Мл	Дослід	Стандарт	Контроль
Сироватка	0,01	--	--
Стандартний розчин глюкози (10 ммоль/л)	--	0,01	--
Дистильована вода	--	--	0,01
Глюкозовий реактив	3,0	3,0	3,0

3. Вміст пробірок перемішати та інкубувати 1 годину при кімнатній температурі (або 30 хв при 37°C) в темному місці.
4. Вимірювати оптичну густину проби “дослід” та “стандарт” проти “контроль” при довжині хвилі 490 нм в кюветі 10 мм. Вимірювання повинні бути проведені до закінчення 5 хв.

Розрахунок:

$$\text{Глюкоза ммоль/л} = 10 \times A_1/A_2, \text{ де}$$

A_1 - оптична густина проби “дослід”.

A_2 - оптична густина проби “стандарт”.

10 - вміст глюкози проби “стандарт”, ммоль/л (М глюкози 180).

Нормальні величини: 4.2-5.1 ммоль/л

Література: 1. J.Fischer, V.Chromy, J.Voznicek: Biochem. s bohemoslov.10,41 (1981), – 2. V.Chromy, J.Voznicek, J.Fischer: Biochem. clin.bohemoslov.10,123 (1981), – 3. Інструкція до набору «Глюкоза ферментативно» фірми «Лаксема» Чехія.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА

ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ КСАНТИНОКСИДАЗИ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Метод оснований на вимірюванні збільшення вмісту сечової кислоти в промі після інкубації розчину ксантину з біологічним зразком.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

- 1 Терези електронні ВЛ Е-134, ГОСТ 24104-88
- 2 Центрифуга ОПН-ЗУХЛ4.2, ТУ 5-375-42-60-76
- 3 Колориметр фотоелектричний концентраційний КФК-2-УХЛ 4.2, ТУЗ-1766-82
- 4 Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74
- 5 Колба мірна місткістю 100, 1000 мл, ГОСТ 1770-74
- 6 Шпетки мірні скляні 1, 10 мл, ГОСТ 20292-74
- 7 Фарфорова ступка
- 8 Термостат ТС -80М-2, ТУ 64-1-1382-83
- 9 Холодильник побутовий, ТУ 84-89
- 10 рН-метр мілівольметр, тип рН-150, ГОСТ 22261-82

РЕАКТИВИ

- 1 Трис - (оксиметіл)-амінометан гідрохлорид, кваліфікація "ч" ТУ 6-09-477-78
- 2 Трис - (оксиметил)-амінометан, кваліфікація "ч" ТУ 6-09-2477-78
- 3 Ксантин
- 4 Натрію гідроксид, кваліфікація "чда", ГОСТ 4328-77
- 5 Кислота соляна концентрована, кваліфікація "чда", ГОСТ 3118-77
- 6 Кислота хлорна, кваліфікація "чда", ТУ 6-09-2878-73

РОЗЧИНИ

- 1 Буферний розчин 0,1 М трис - НСІ, рН 8,0: наважку трис-(оксиметіл)-амінометану 12,2 г зважену з точністю 0,005 г розчинити у 500 мл дистильованої води, долити 500 мл розчину 0,1 н соляної кислоти. Перевірити рН середовища. Зберігати 2 тижні при + 4° С.
- 2 Вихідний розчин ксантину (0,03 М). При нагріванні розчинити 4,5 мг ксантина в 1мл 0,05 М розчину натрію гідроксиду.
- 3 Робочий розчин ксантину на буферному розчині (90мкг/мл): до 0,2 мл вихідного розчину ксантину додати 9,8 мл буферного розчину.
- 4 10% розчин хлорної кислоти: відміряти у мірну колбу на 100 мл 42,1 мл 57% хлорної кислоти, долити дистильованої води до мітки, перемішати.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

Визначається у сироватці, тканині печінки або тонкого кишечника.

1. Приготувати гомогенат печінки або тонкого кишечника. Для відважити тканину, гомогенізувати з дистильованою водою і центрифугувати, використовувати надосадову рідину. Гомогенат розвести у 10 разів, гомогенат тонкого кишечника – у 50 разів.
 2. Приготувати пробірки “дослід”, “контроль”. В пробірку “дослід” набрати 2,8 мл буфера, в “дослід” – 2,8 мл робочого розчину ксантина.
 3. В пробірки “контроль” та “дослід” додати по 0,2 мл проби (сироватки або надосадової рідини), перемішати.
 4. Пробірки інкубувати 60 хв при 37°C.
 5. Проби охолодити на льоду або в холодильнику і додати по 1 мл розчину хлорної кислоти. Перемішати та залишити в холодильнику для формування осаду (від 1 години до 24 годин).
 6. Центрифугувати при 3000 об/хв 15 хв.
 7. Виміряти екстинкцію проти дистильованої води при двох довжинах хвилі: 290 нм (специфічна область поглинання сечової кислоти) і 330 нм (неспецифічна опалесценція розчину) іноді проти проби “контроль на реактиви”: 2,8 мл робочого розчину ксантина, 0,2 мл буфера, 1 мл 30% розчину хлорної кислоти.
- Розрахунок: $E = E_{\text{досл}} - E_{\text{контр}}$

$$E \times 4 \text{ мл} \times 5000$$

$$\frac{\quad}{0,0125 \times 3600 \times \text{розвед.}} = E \times 444,4 \text{ нкатал/л сироватки, лг}$$

$E \times 4444,4$ нкатал/кг печінки за сек,

$E \times 22220$ нкатал/кг тонкого кишечника за сек,

4 мл - об'єм в кюветі,

5000 - перерахунок з 0,2 мл на 1,0 літр,

3600 - сек в 1 год.,

0,0125 М/см - молярний коефіцієнт екстинкції сечової кислоти.

Література: Westerfeld w.w.at al.; Cancer Res, Vol. 10. – 1950. – № 8. – P. 486-4

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ПО ВИЗНАЧЕННЮ АКТИВНОСТІ ЛЕЙЦИНАМІНОПЕПТИДАЗИ (ЛАП) (Набір «LAP-test» VEB Laborchemie apolda - Feinchemie. Sebnitz)

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Лейцингідразид під дією ЛАП сироватки крові розщеплюється. Вивільнений гідразид зв'язується з 4-диметиламінобензальдегідом середовищі соляної кислоти і утворює забарвлений продукт.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

Спектрометр ТС-80М, ТУ 64-1-1382-83

Фотометр фотоелектричний концентраційний КФК-2-УХЛ 4.2, ТУ 3-170-82

Мірні скляні місткістю 2, 5, 1=0 мл, ГОСТ 20292-74

Мірні скляні місткістю 25, 500, 100, 1000 мл, ГОСТ 1770-74

Мірний скляний місткістю 25 мл, ГОСТ 1770-77

РЕАКТИВИ (З НАБОРУ)

Аммоніачний буфер, рН 10,5: 2-аміноетанолгідрохлориду, 200 ммоль/л. Готувати при температурі 2-8°C;

Лейцингідразид 201 ммоль/л, (RL). Розчинити в 5 мл дистильованої води при температурі 12°C. Стабільний 21 день.

Лейцингідразид 40,3 ммоль/л, (RL*). 1 об'єм лейцингідразиду RL (3) і 4 об'єми гістаміноамінового буферу (2). Готувати перед використанням.

Дистиліапінамінобензальдегід 15,8 ммоль/л. Вміст флакону розчинити в метанолу або метанолу і довести до 300 мл соляною кислотою ммоль/л. Розчин стабільний при температурі 2-8°C в темному посуді.

Гістазину 3,43 ммоль/л, (VL). 2 мл вмісту флакона розчинити у воді в мірній до 25 мл. Стабільний в темному посуді при температурі 2-8°C.

Гістазину 34,3 ммоль/л, (VL*). 1 мл гістазину (5) довести водою до 100 мл. Стабільний при температурі 2-8°C в темному посуді.

Сироватка 100 ммоль/л (0,1 М) Готувати із стандарт-титрів. В мірну колбу місткістю 1000 мл перенести вміст ампули стандарт-титра соляної кислоти (0,1 М). Ампулу добре промити дистильованою водою, збираючи залишки води в мірну колбу. Вміст колби перемішати, додати розчин дистильованою водою до мітки на колбі та ще раз добре перемішати. Розчин зберігати у скляній з притертою пробкою при кімнатній температурі.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

Сироватку використовувати для аналізу на протязі 6 годин при температурі 2-8°C. Не використовувати гемолізовану сироватку.

	Дослід	Контроль 1	Стандарт	Калібровка	Контроль 2
Лейцингідразин RL*, мкл	500	500	-	-	-
Гістазину VL*, мкл	-	-	700	-	-
Калібровочні розчини, мкл	-	-	-	700	-
Дистильована вода, мкл	-	-	-	-	700
Інкубувати при 37°C	10 хв	40 хв			
Сироватка, мкл	200	-	-	-	-
Інкубувати 30 хв					
Дистиліапінамінобен-альдегід RL, мл	5	5	5	5	5
Сироватка, мкл	-	200	-	-	-

2. Інкубувати 30 хв при 37°C.

3. Охолодити до температури + 20°C та колориметрувати при 455 нм (450-460 нм) в кюветі 10 мм. Дослід вимірювати проти контролю 1. Стандарт і калібровку - проти контролю

$$\text{Активність ЛАП} = \frac{E_{\text{досл}} \times 66,7}{E_{\text{ст}}} \text{ нмоль/сек} \times \text{л}$$

4. Побудова калібрувальної кривої: 50, 100, 200, 300, 400 мл гідразина домішного розведення дистильованою водою до 10 мл. По 700 мл кожного розведення використовувати в реакції (4 колонка таблиці). Вимірювати екстинкцію проти контролю 2. Активність відповідає 33,3; 66,7; 133; 200, 267 нмоль/сек \times л. Норма для людини: < 83 нмоль/(сек. \times л).

Можливі коливання: 84-125 нмоль/(сек. \times л).

Патологічні: > 126 нмоль/(сек. \times л).

Література: Haschen R.J. Enzymdiagnostik. VEB Gustav Fisher Verlag Jena, 1978.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ЛІПАЗИ В СИРОВАТЦІ АБО ПЛАЗМІ КРОВІ (турбідиметричний метод)

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Спектрофотометричне вимірювання зміни помутніння суспензії оливкової олії під дією ліпази. Активність ферменту пропорційна кількості гідролізованої оливкової олії або кількості жирних кислот, що утворюються при гідролізі. (Ліпаза є термолабільним ферментом і при температурі 37°C частково інактивується).

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Центрифужні пробірки, ГОСТ 1770-74
2. Спектрофотометр СФ-46, (Ломо, Росія), ТУ-2Т 1.540.008
3. Термостат ТС-80 М, ТУ 64-1-1382-83
4. рН-метр-мілівольтметр, тип рН-150, ГОСТ 22261-82
5. Фільтрувальний папір (синя стрічка), ТУ 6-09-1678-77
6. Штативи для пробірок поліетиленові ШППО 2-40, ТУ 64-1-2669-83

РЕАКТИВИ

1. Оливкова олія (виробництво Іспанія)
2. Оксид алюмінію, (виробництво "Hungary")
3. Концентрована соляна кислота, кваліфікація "чда", ГОСТ 31180-77
4. Спирт абсолютний, ТУ 6-09-5100-83

- Трис (оксиметил)-амінометан, кваліфікація "ч" ТУ 6-09-2477-78
- Натрій дезоксихолат

РОЗЧИНИ

- Очищення оливкової олії: в колбу 50 мл помістити 25 мл оливкової олії, 5 г порошку алюмінію, струшувати 1 год. Потім олію перелити в центрифужні пробірки (пластмаси) і центрифугувати 30 хв при 5000 об/хв. Олію після центрифугування профільтрувати через цупкий паперовий фільтр (синя стрічка).
- Основний розчин оливкової олії 0,011 моль/л. В колбу з притертою пробкою налити 100 мл абсолютного спирту, прилити піпеткою 1,1 мл оливкової олії (кінець піпетки повинен знаходитись близько до поверхні спирту, колбу обернути коловими рухами). Потім колбу ставити на 1 годину для струшування. Зберігати при кімнатній температурі.
- Буфер, який містить трис-(оксиметил)-амінометан 0,025 моль/л і в якості регулятора натрій-дезоксихолат 0,014 моль/л (рН 8,8): 0,3 г триса і 0,6 г дезоксихолат натрію розчинити в 40-60 мл дистильованої води, довести рН до 8,8 концентрованою соляною кислотою (3-8 крапель) і долити водою до об'єму в скляній колбі до 100 мл. Зберігати в холодильнику 2 тижні.
- Робоча емульсія оливкової олії, 0,00017 моль/л: 1,5 мл основного розчину оливкової олії повільно додати до 100 мл буфера рН 8,8. Кінчик піпетки опустити над поверхнею емульсії. Зберігати в холодильнику 2 тижні.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

- Сироватку і реактиви прогріти до кімнатної температури.
- В центрифужну пробірку прилити 3 мл робочої емульсії оливкової олії.
- Додати 0,1 мл сироватки, перемішати без струшування.
- Поставити в термостат на 2 хв при 37°C.
- Вимірити екстинкцію проби E_1 через 2 хв проти води при 340 нм в кюветі товщиною шару 1 см.
- Вміст кювети знову перелити в пробірку і помістити в термостат ще на 2 хв.
- Вимірити екстинкцію проби E_2 через 5 хв після прогрівання в термостаті.
- Активність ліпази визначати по кількості зруйнованої олії (мкмоль) за певну хву під дією ліпази, яка містить у 1 літрі сироватки.

Розрахунок

$$\text{Активність} = \frac{E_{\text{доп}} \times 170 \times 3 \times 1000}{E_k \times 1000 \times 0,1} = 510 \frac{E_{\text{доп}} \text{ мкмоль}}{E_k \text{ хв.л}}, \text{ де}$$

- $E_{\text{доп}}$ - зміна екстинкції дослідної проби за 1 хву ($E_1 - E_2$)/5,
- E_k - екстинкція робочої емульсії оливкової олії,

170 - концентрація оливкової олії в робочій емульсії, мкмоль/л, при екстинкція рівна 1.

3/1000 - об'єм робочої емульсії оливкової олії в л,

1000/0,1 - коефіцієнт перерахунку на 1 л сироватки.

Лінійна залежність зберігається до 204 мкмоль/л оливкової олії.

Нормальні величини: 0 - 28 мкмоль/хв.л

Нормальні величини треба перевіряти в кожній лабораторії

$$\text{актив.} \frac{\text{мкмоль}}{\text{хв. л}} = \frac{(E_1 - E_2) \times 170 \times 3 \times 1000}{E_1 - E_2} = \frac{E_1 - E_2}{E_1} \times 1,02 \times 10^6$$

$$\text{хв. л} = 5 \times E_k \times 1000 \times 0,1$$

$$\text{нмоль} = \frac{E_1 - E_2}{E_1} \times 10^6$$

$$\text{актив.} = 16,67 \times 1,02 \times 1000 \times \frac{E_1 - E_2}{E_k} = 17,0 \times 1000 \frac{E_1 - E_2}{E_k}$$

$$\text{с л} = \frac{E_1 - E_2}{E_k} \times 10^6$$

Примітка: в сироватці крові активність ферменту нижча.

Література: Лабораторные методы исследования в клинике / Под ред. Меньшикова В.В. - М.: Медицина, 1987. - С. 200-202.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА

ВИЗНАЧЕННЯ СПЕКТРУ НЕЙТРАЛЬНИХ ЛІПІДІВ МЕМБРАН ЕРИТРОЦИТІВ ТА СИРОВАТКИ КРОВІ МЕТОДОМ ТСХ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Нейтральні ліпіди, екстраговані з мембран еритроцитів методом Блума і Дайера, розділяють в тонких прошарках силікагелю на скляних пластинках за допомогою суміші: петролейний ефір, діетиловий ефір, мурашина кислота (80:20:2).

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Центрифуга ОПН-ЗУХЛ4.2, ТУ 5-375-42-60-76
2. Ротаційний вакуумний випарювач
3. Скляні фотопластини 9x12 см
4. Сухожарова шафа 2В-151, ТУ 64-1-1111-72
5. Хроматограф рідинний мікроколонуний «Міліхром-4», ТУ 7405.009-89
6. Спектрофотометр СФ-46 (Ломо, Росія), ТУ 3-3. 1841-84
7. рН-метр-мілівольтметр, тип рН-150, ГОСТ 22261-82

РЕАКТИВИ

1. Калій фосфорнокислий однозаміщений, кваліфікація "чда" ГОСТ 41984
2. Натрій фосфорнокислий двозаміщений, кваліфікація "чда" ТУ 64-64-7

- 1 Натрію хлорид, кваліфікація "чда" ГОСТ 4233-77
- 2 Висока льодяна оцтова (ЛОК), кваліфікація "чда" ГОСТ 61-75
- 3 Концентрована сірчана кислота, кваліфікація "чда" ГОСТ 4204-77
- 4 Над кристалічний, кваліфікація "чда" ТУ 6-09-25-45-72
- 5 Метанол, ГОСТ 6995-77
- 6 Хлороформ, кваліфікація "ч" ТУ 6-09-800-76
- 7 Силікагель («Сетарол», Merck)
- 8 Геласан, кваліфікація "хч", (Голландія)
- 9 Ліфр для наркозу стабілізований (м. Шостка, Україна)

РОЗЧИНИ

- 1 Розчин хлориду натрію: наважку хлориду натрію масою 0,9 г зважити точно 0,005 г, розчинити в 91 мл дистильованої води, перемішати.
- 2 Розчин хлороформ-метанол: змішати 1 частину хлороформу та 1 частину метанолу, перемішати. Готувати перед використанням

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

- 1 Отримання мембран еритроцитів (Петрова М.П. и др., 1978): еритроцити слід відмити ізотонічним фосфатним буфером рН 7,4, гемолізувати дистильованою водою в співвідношенні 1: 100, і один раз відмити мембранні 0,9% розчином хлориду натрію.

Сироватку для аналізу використовувати свіжу, негемолізовану.

- 2 Метод екстракції ліпідів (Bligh E.J., Dyer W.L., 1959):

- а) 1 мл суспензії мембран еритроцитів (отриманих з 1 мл крові), чи 1 мл сироватки крові змішати з 3,75 мл суміші хлороформ-метанол у співвідношенні 1: 1.
- б) Перемішати, витримувати 1 годину. Пробу центрифугувати 15 хв при 3000 об/хв на центрифугі типу.

Супернатант відібрати, до осаду долити 75 мл суміші хлороформ-метанол (1: 1) та 1 мл дистильованої води, ретельно перемішати, витримати 1 годину. Пробу центрифугувати в тих же умовах, супернатанти об'єднати. До об'єднаних супернатантів долити 2,5 мл хлороформу та 2,5 мл дистильованої води, ретельно інтенсивно перемішати, центрифугувати 30 хв при 3000 об/хв. Проба розшаровується на 3 шари. Нижній хлороформений шар, який містить ліпіди, ретельно зібрати, випарувувати насухо в ротаційному вакуумному випарювачі, залишок розчинити в 1 мл хлороформу і використати для хроматографії.

б) Хроматографія нейтральних ліпідів в тонкому шарі силікагелю. Пластини для ТСХ приготувати шляхом нанесення на відмиті скляні фторопластини розміром 9x12 см шару силікагелю 5/40 меш. Товщина шару 0,4 мм. Перед хроматографією пластини активувати в сухожаровій шафі при 110°C 1 годину. На старт нанести 0,1 мл хлороформенного екстракту ліпідів. Нанесення екстракту треба проводити в декілька прийомів з ретельним підсушуванням після кожного проміжного

нанесення, щоб кінцевий діаметр нанесеної проби не перевищував 1 мм. Пластини помістити в плоску скляну камеру для хроматографічної наступною системою розчинників - гексан, ефір, льодяна оцтова кислота в співвідношенні 80:20:2. Розгонку вести до наближення фронтів розчинників до верхнього краю пластини, після чого пластини вийняти з камери, витримувати на повітрі до повного випаровування розчинників і проявити в парах йоду. Знайдені плями ліпідів окреслити (з запасною голкою, і пластини залишити на повітрі до повного випаровування розчинників). Далі окреслені ділянки силікагелю зчистити в пронумеровану пробирку додати по 5 мл концентрованої сірчаної кислоти та помістити в сушильну шафу на 1 годину при температурі 200°C. Після цього центрифугувати 30 хв при 3000 об/хв, супернатант фотометрувати в довжині хвилі 600 нм в кюветах 10 мм товщиною. Розподіл фракцій в спектрі - сума фосфоліпідів, друга пляма - вільний холестерин, третя - вільні жирні кислоти, четверта - тригліцериди, п'ята - ефіри холестерину. Ідентифікацію плям проводити по свідкам, які треба розганяти паралельно пробам.

Розрахунок відносного вмісту ліпідів по фракціям проводити таким чином: суму екстинкцій всіх фракцій ліпідів однієї проби прийняти за 100% і пропорціонально екстинкціям розрахувати процентний вміст ліпідів кожній фракції проби.

Література: Абрамзон М.А., Егорова Р.П. Метод исследования липидов спектра крови с помощью тонкослойной хроматографии на силикагеле. Лабораторное дело. - 1971. - № 2. - С. 118.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ПІРОВИНОГРАДНОЇ КИСЛОТИ (ПВК) В ПЕЧІНЦІ ТВАРИН

ПРИНЦИП МЕТОДУ

ПВК і 2,4-динітрофенілгідразин (2,4-ДНФГ) утворюють гідразон, який дає в лужному середовищі забарвлення, інтенсивність якого пропорційна концентрації ПВК.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Колориметр фотоелектричний концентраційний КФК-2-УХЛ 4.2, ТУ 3. 1766-82
2. Терези лабораторні ВЛР-200, 2-й клас, ГОСТ 19491-74
3. Терези електронні ВЛ Е -134, 2-й клас ГОСТ 104-88
4. Лійки скляні діаметром 30, 70 мм, ГОСТ 1770-74
5. Дозатори піпеткові ПІ- 50, ПІ-100, ПІ-1000, ТУ 64-1-3329-81

- 18 Мірні місткості 25, 50, 100 мл, ГОСТ 1770-74
- 19 Мірні хімічні місткості 250 мл, ГОСТ 1770-74
- 20 Шестки скляні градуйовані місткістю 1, 2, 10 мл, 2-й клас, ГОСТ 20292-74
- 21 Пробірки хімічні, ГОСТ 25336-82
- 22 Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74
- 23 Плита електрична з закритою спіраллю, тип ЕПШ-1-0,8, ГОСТ 14919-83
- 24 Стакани хімічні місткістю 50, 100 мл, ГОСТ 1770-74
- 25 Ступка фарфорова діаметром 70 мм
- 26 Холодильник побутовий, ТУ 84-89
- 27 Центрифуга лабораторна ОПН-3 УХЛ 4.2, ТУ 5.375-4260-76
- 28 Циліндри мірні місткістю 50, 100 мл, ГОСТ 1770-74
- 29 Штативи для пробірок поліетиленові ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669-83
- 30 Штативи круглі металічні для пробірок $d=20$ мм, ТУ 64-1-359-7

РЕАКТИВИ

- 1 Динітрофенілгідразин (ДНФГ), кваліфікація «чда» ТУ 6-09-2394-77
- 2 Кислота соляна концентрована, кваліфікація «чда» ГОСТ 3118-77
- 3 Кислота трихлороцтова (ТХО), кваліфікація «чда» ТУ 6-09-1926-77
- 4 Натрію гідрокарбонат, кваліфікація «чда» ГОСТ 4201-79
- 5 Натрію гідроксид, кваліфікація «чда» ГОСТ 4328-77
- 6 Натрію піруват, кваліфікація «чда» ТУ 6-09-5235-85
- 7 Тіоурол, кваліфікація «чда» ГОСТ 5989-78

РОЗЧИНИ

- 1 Розчин 2,4-динітрофенілгідразину (розчин ДНФГ) 0,1% в 0,1 М розчині нічної кислоти: наважку ДНФГ масою 0,1 г, зважену на електронних терезах, перенести в хімічну колбу, розчинити в 9 мл концентрованої нічної кислоти, відміреної за допомогою піпетки мірної місткістю 10 мл, при кип'ятінні на водяній бані при температурі 60-65°C. Розчин охолодити дистильованою водою та кількісно перенести до мірної колби місткістю 100 мл, довести об'єм розчину до мітки на мірній колбі дистильованою водою та ретельно перемішати. Розчин витримати при кімнатній температурі протягом однієї доби. При необхідності розчин профільтрувати через фільтрувальний папір. Зберігати в темному місці 3-4 місяці;
- 2 10% розчин гідрокарбонату натрію: 10 г гідрокарбонату натрію, зваженого на електронних терезах з точністю до 0,1 г, розчинити в 90 мл дистильованої води, відміреної за допомогою мірного циліндра місткістю 100 мл, при слабкому нагріванні. Розчин повинен бути прозорим; при утворенні осаду розчин для роботи непридатний;
- 3 Розчин гідроксиду натрію 1,5 М: наважку гідроксиду натрію масою 0,015 г, зважену на терезах з точністю до 0,005 г, розчинити в 50-60 мл дистильованої води, кількісно перенести в мірну колбу місткістю 100 мл;

об'єм розчину довести дистильованою водою до мітки та ретельно перемішати. Зберігати в поліетиленовому посуді; при утворенні осад розчин для роботи непридатний;

4. Розчин калібратора 1,5 М (ПВК 1 мг/мл): наважку пірувату натр-0,625 г, зважену на терезах з точністю 0,00005 г, помістити в мірну колбу місткістю 500 мл, розчинити приблизно в 200 мл дистильованої води, додати воду до мітки на мірній колбі та ретельно перемішати. Розчин зберігати в холодильнику при температурі +4 - +8°C протягом 1 місяця.

5. Стандартний розчин пірвіноградної кислоти (ПВК) 0,2 мг/мл: (готується з розчину калібратора) мірною піпеткою місткістю 5 мл відібрати 5 мл розчину калібратора, перенести до мірної колби місткістю 25 мл, додати дистильовану воду до мітки на мірній колбі, перемішати. Зберігати в холодильнику при температурі +4 - +8°C протягом 1 тижня.

6. 10% розчин трихлороцтової кислоти (ТХО): наважку ТХО масою 10 г зважену на терезах з точністю 0,1 г, розчинити в 90 мл дистильованої води, відміреної за допомогою мірного циліндра місткістю 100 мл. Розчин стійкий.

7. 5% розчин трихлороцтової кислоти (ТХО): наважку ТХО масою 5 г зважену на терезах з точністю 0,1 г, розчинити в 95 мл дистильованої води, відміреної за допомогою мірного циліндра місткістю 100 мл. Розчин стійкий.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. Приготувати центрифужні пробірки (число цих пробірок дорівнює числу проб, що аналізуються); в пробірки налити по 2 мл 10% ТХО.

2. Взяти наважку тканини печінки масою 0,100 г на електронних терезах з точністю до 0,005 г.

3. Наважку печінки розтерти в фарфоровій ступці з невеликою кількістю 10% ТХО, яка налита в центрифужні пробірки, до утворення гомогенної маси. Потім з цієї ж пробірки налити в ступку з гомогенатом приблизно половину розчину ТХО, що залишився, і знов розтерти. Гомогенат перенести в чисту охолоджену центрифужну пробірку, на якій зазначено номер проби, що аналізується. Залишки розчину ТХО вилити в ступку, промити ступку і товкачик; змив перенести в центрифужну пробірку гомогенатом. Дати постояти 10 хв.

4. Центрифугувати 10 хв при 3000 об/хв.

5. В металічний штатив поставити хімічні пробірки, які позначені відповідним номером проб, що аналізуються, та ще пробірку "контроль" і дві пробірки "стандарт".

6. Центрифугат злити в хімічні пробірки.

7. До осаду додати 0,5 мл 5% розчин ТХО, відміреної дозатором піпетковим, перемішати.

8. Знову центрифугувати 10 хв при 3000 об/хв.

9. Центрифугат злити в ті ж хімічні пробірки, осад відкинути.

- В хімічну пробірку "контроль" налити 2 мл 10% ТХО, 0,45 мл 5% ТХО і 0,05 мл дистильованої води.
- В хімічні пробірки "стандарт" налити 2 мл 10% ТХО, 5% ТХО і 0,05 мл стандартного розчину ПВК.
- В усі пробірки внести 0,5 мл 0,1% розчину ДНФГ.
- Пробірки залишити в темноті на 20 хв.
- В усі хімічні пробірки скляною піпеткою прилити по 2 мл толуолу.
- Струшувати протягом 2 хв для екстракції гідразону пірвіноградної кислоти, дати постояти для розшарування.
- Верхній шар, забарвлений в жовтий колір, відібрати за допомогою мірної піпетки в чисту хімічну пробірку.
- До нижнього водного шару, що залишився, повторно додати по 2 мл толуолу.
- Струшувати протягом 2 хв, після чого дати постояти для розшарування.
- Верхній шар знов відібрати і перенести в хімічну пробірку з чистим відібраним верхнім шаром жовтого кольору. Водний шар викинути.
- В пробірку з відібраним верхнім шаром долити 2 мл розчину гідроксиду натрію.
- Струшувати протягом 5 хв, дати постояти до розшарування, при цьому водний шар пірвіноградної кислоти переходить в лужний водний розчин (жовтий шар).
- З нижнього шару за допомогою мірної піпетки місткістю 2 мл відібрати 1,5 мл водно-лужного екстракту і перенести в чисту центрифужну пробірку.
- Прилити в центрифужну пробірку 1,5 мл розчину гідроксиду натрію і добре перемішати.
- Дати постояти 10 хв для утворення червоно-бурого кольору.
- Визначити оптичну густину проб "дослід" та "стандарт" проти проби "контроль" на колориметрі фотоелектричному при довжині хвилі 440 нм шляхеті з довжиною оптичного шляху 5мм.
- Концентрацію ПВК в тканині визначати за формулою:

$$C_{\text{ПВК}} = \frac{V_{\text{ст}} \cdot C_{\text{ст}} \cdot E_{\text{досл}}}{E_{\text{ст}}} \times 10^4 \text{ мг/кг, де}$$

$V_{\text{ст}}$ — об'єм стандартного розчину, мл; дорівнює 0,05 мл;

$C_{\text{ст}}$ — концентрація стандартного розчину, мг/мл, дорівнює 0,2 мг/мл;

$E_{\text{ст}}$ — оптична густина проби "стандарт";

$E_{\text{досл}}$ – оптична густина проби “дослід”;
 10^4 – коефіцієнт перерахунку на 1 кг маси печінки.

$$C_{\text{пвк}} = \frac{0,05 \times 0,2 \times E_{\text{досл}}}{E_{\text{ст}}} \times 10^4 = 100 \frac{E_{\text{досл}} \text{ мг}}{E_{\text{ст}} \text{ кг}}$$

Побудова калібрувальної кривої.

1. Приготувати калібрувальні розчини ПВК за схемою, приведеною в таблиці (калібрувальна крива становить собою пряму від початку координат):

№ калібрувального розчину	Об'єм розчину калібратору (1 мг/мл ПВК), мл	Об'єм дистильованої води, мл	Кінцева концентрація ПВК в калібрувальному розчині, мг/мл
1	4	6	0,4
2	3	7	0,3
3	2	8	0,2
4	1	9	0,1
5	0,5	9,5	0,05
6	0,25	9,75	0,025

2. В хімічну пробірку налити 2 мл 10% ТХО, 0,5 мл 5 % ТХО і 0,05 мл калібрувального розчину. Перемішати, далі провести аналіз за п.п. 12 – 14. Калібрувальний графік будують в координатах оптична густина – концентрація.

Нормальні величини: концентрація ПВК в печінці шурів в нормі складає $20 \pm 2,3$ мг/кг.

Література: 1. Биологическая химия. Практикум / Под ред. Ю. Хмелевского. - К.: Вища школа, 1985. - С. 59. – 2. Трахтенберг И.М. и др. Проблемы нормы в токсикологии. – М.: Медицина, 1991. – С. 97.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ТБК АКТИВНИХ ПРОДУКТІВ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

2-тіобарбітурова кислота (ТБК) при нагріванні з альдегідами утворює триметиновий комплекс, що має максимум світлопоглинання при 532 нм.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Дозатор автоматичний поршневий медичний, А-2, ТУ 64-1-2828-81
2. Дозатор піпетковий ПІ-0,5, ПІ-1,0, ТУ 64-1-3329-81

- 1. Колориметр фотоелектричний концентраційний КФК-2-УХЛ 4.2, ТУ 3-1766-82
- 2. Полюна баня
- 3. Терези торсіонні ВТ-500 ТУ 64-1-990-81
- 4. Терези електронні ВЛ Е-134, ГОСТ 24104-88
- 5. рН-метр-мілівольтметр, тип рН-150, ГОСТ 22261-82
- 6. Колби мірні місткістю 50, 100, 1000 мл, ГОСТ 1770-74
- 7. Колби хімічні місткістю 100, 1000 мл, ГОСТ 1770-74
- 8. Піпетки скляні градуйовані місткістю 2, 5, 10 мл, 2-й клас, ГОСТ 20292-74
- 9. Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74
- 10. Пробірки хімічні, ГОСТ 25336-82
- 11. Пивга електрична з закритою спіраллю тип ЕПШ-1-0,8, ГОСТ 14919-83
- 12. Термостат ТС-80 М, ТУ 64-1-1382-83
- 13. Холодильник побутовий, ТУ 84-89
- 14. Циліндри мірні місткістю 100, 1000 мл, ГОСТ 1770-74
- 15. Центрифуга лабораторна ОПН-3 УХЛ 4.2 ТУ 5.375-4260-76
- 16. Штативи для пробірок поліетиленові ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669-83
- 17. Штативи круглі металічні, ТУ 64-1-359-79

РЕАКТИВИ

- 1. Лізіо сірчано-кисле семиводне, кваліфікація «чда» ГОСТ 4148-78
- 2. Кислота аскорбінова, (Київський вітамінний завод)
- 3. Кислота соляна, стандарт-титри, 0,1 н ТУ 6-09-2540-87
- 4. Кислота тіобарбітурова (ТБК), кваліфікація «чда» ТУ 6-09-10-1842-89
- 5. Кислота трихлороцтова (ТХО), кваліфікація «чда» ТУ 6-09-1926-77
- 6. Натрію хлорид, кваліфікація «чда» ТУ 6-09-5222-85
- 7. Трис-(окси)-метиламінометану, кваліфікація «чда» ТУ 6-09-2477-78

РОЗЧИНИ

- 1. Буферна суміш рН 7,4.: в мірну колбу місткістю 1000 мл, в яку налито майже 500 мл дистильованої води, перенести 1,9 г трис-(окси)-метиламінометану, зваженого з точністю до 0,01 г, 50 мл розчину соляної кислоти, відміреної з точністю до 1 мл, 1,4 г аскорбінової кислоти, зваженої з точністю до 0,01 г, 0,032 г заліза сірчано-кислого семиводного, зваженого з точністю до 0,001 г. Реактиви переносити в тому порядку, в якому це вказано вище; при цьому наступний реактив додавати лише після повного розчинення попереднього. Долити дистильовану воду майже до країв на мірній колбі, добре перемішати і залишити суміш у темряві на 1 добу. За цей час колір суміші повинен змінитися з синьо-фіолетового на світлий. Через одну добу перевірити рН суміші і в разі необхідності довести її до значення 7,4, обережно невеликими порціями додаючи трис-(окси)-

метиламінометан, якщо рН менше 7,4, або розчин соляної кислоти, якщо рН більше 7,4. Розчин зберігати в холодильнику протягом 1 місяця при температурі $+8 - +10^{\circ}\text{C}$;

2. Розчин соляної кислоти, концентрація 0,1 н. Готувати із стандартів: в мірну колбу місткістю 1000 мл перенести (дуже обережно, допускаючи розбризкування розчину!) соляну кислоту із ампули стандартів. Ампулу добре промити дистильованою водою, збирати промивні води в мірну колбу. Розчин у колбі перемішати, долити дистильованою водою до мітки на колбі та ще раз добре перемішати. Розчин стійкий; зберігати у склянці з притертою пробкою при кімнатній температурі;

3. Розчин тіобарбітурової кислоти (розчин ТБК), концентрація 0,1% (мас.-об'єм): в хімічну колбу місткістю 100 мл перенести 0,1 г тіобарбітурової кислоти, зваженої на торсійних терезах з точністю до 0,001 г, 100 мл дистильованої води, відміреної з точністю до 1 мл; постійно перемішуючи нагрівати на водяній бані до повного розчинення ТБК; розчин ТБК готувати безпосередньо перед використанням, зберігання не підлягає;

4. Розчин трихлороцтової кислоти (розчин ТХО), концентрація 30% (мас.-об'єм): в хімічну колбу місткістю 1000 мл перенести 300 г ТХО, зваженої на терезах з точністю до 0,01 г, 700 мл дистильованої води, відміреної з точністю до 1 мл, та добре перемішати. Розчин стійкий; зберігати в темній склянці з притертою пробкою при кімнатній температурі;

5. Розчин хлориду натрію, концентрація 0,9% (0,15 М): в мірну колбу місткістю 1000 мл перенести 9,0 г хлориду натрію, зваженого на терезах з точністю до 0,1 г, долити дистильованої води та перемішати до повного розчинення хлориду натрію; довести розчин дистильованою водою до мітки та ще раз ретельно перемішати; розчин зберігати в холодильнику протягом 2 місяців при температурі $+8 - +10^{\circ}\text{C}$.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. В поліетиленовий штатив для пробірок помістити три ряди центрифужних пробірок, на яких написаний номер проби, а також четвертий ряд центрифужних пробірок, на яких написаний номер проби із штрих-кодом. Кількість пробірок в ряду відповідає кількості проб, що підлягають аналізу.
2. В перший ряд пробірок налити 4 мл розчину хлориду натрію, в другий ряд 4,5 мл буферної суміші.
3. В перший ряд пробірок додати 2 мл крові, добре перемішати та центрифугувати при 1500 об/хв протягом 10 хв.
4. Відібрати 0,5 мл еритроцитів, що містяться на придонній частині пробірок. Еритроцити відбирати обережно, не допускаючи змішування їх з плазмою.
5. Перенести відібрані еритроцити в пробірку другого ряду та змішати з налитим в неї буферним розчином до отримання однорідної суміші.

Витрати 2 мл суміші в пробірку третього, та 2 мл суміші в пробірку четвертого ряду.

У пробірки четвертого ряду, позначені номером із штрихом, помістити в термостат на інкубацію при температурі 37°С протягом 10 хв.

У пробірки третього ряду, позначені номером, додати 1 мл розчину ТБК, перемішати скляною паличкою та центрифугувати при 3000 об/хв протягом 30 хв.

Для пробірок набрати два ряди хімічних пробірок. Кількість реактиву у кожному ряду дорівнює кількості проб, що аналізуються; крім того в штатив ставиться ще одна пробірка для контролю на реактиви. Пробірки першого ряду підписати номером проби, другого - номером пробірки з штрихом.

У пробірки 2 мл супернатанту та перенести його в хімічну пробірку, позначену відповідним номером.

Після закінчення терміну інкубації штатив з пробірками, позначеними номером із штрихом, витягнути з термостату і провести операції, що описані п.п. 8 та 10.

У хімічні пробірки для контролю на реактиви налити 1,2 мл буферної розчину, 0,7 мл розчину ТХО та 0,1 мл дистильованої води.

У хімічні пробірки налити 3 мл розчину ТБК, добре перемішати та помістити їх у круглий металевий штатив.

Штатив з пробірками помістити на водяну баню і витримати при температурі кипіння води протягом 50 хв.

Пробірки охолодити водопровідною водою та вимірювати оптичну густину розчинів, що знаходяться в них, на КФК-2 в кюветі з довжиною оптичного шляху 10 мм при довжині хвилі 540 нм (зелений світлофільтр) для контролю на реактиви.

Концентрацію ТБК-активних продуктів в еритроцитах крові обчислювати за формулою:

$$C_{\text{мдл}} = 240,4 \times E, \text{ де}$$

$C_{\text{мдл}}$ - концентрація ТБК-активних продуктів, мкМ;
 E - коефіцієнт, що враховує молярний коефіцієнт поглинання розчину, взятої для аналізу проби еритроцитів, розбавлення проби в ході аналізу, довжину оптичного шляху.
 $C_{\text{мдл}}$ - екстинкція проби.

Нормальні показники: $7,19 \pm 0,51 - 11,34 \pm 0,52$ (мкмоль/л)

Література: Владимирова Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов биологических мембранах. - М.: Наука, 1972. - 252 с.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ПРОБИ ВЕЛЬТМАНА

ПРИНЦИП МЕТОДУ

При внесенні до сироватки крові (сироватка не повинна бути гемолізована) розчину хлориду кальцію і дії нагрівання відбувається порушення колоїдної стійкості сироватки.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Піпетки скляні місткістю 1, 2, 10 мл, 2-й клас ГОСТ 20292-74;
2. Пробірки хімічні, ГОСТ 25336-82
3. Дозатор піпетковий П1-0,1, ТУ 64-1-3329-81
4. Газовий (спиртовий) пальник
5. Плита електрична з закритою спіраллю, тип ВПШ-1-0,8, ГОСТ 14919
6. Колби мірні місткістю 50, 100 мл, ГОСТ 1770-74
7. Баня водяна
8. Циліндр мірний місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74
9. Стакани хімічні, ГОСТ 1770-74

РЕАКТИВИ

Хлорид кальцію, кваліфікація "ч" ТУ 6-09-4711-81

РОЗЧИНИ

1. 5% розчин хлориду кальцію: наважку хлориду кальцію масою 5 г, зважену з точністю 0,005 г, розчинити в 95 мл дистильованої води, перемішати.
2. 0,5% розчин хлориду кальцію (готується розведенням із 5% розчину хлориду кальцію): відміряти у хімічний стакан 10 мл 5% розчину хлориду кальцію і додати 90 мл дистильованої води.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. В хімічні пробірки по кількості проб внести 0,1 мл сироватки та 4,9 мл дистильованої води.
2. Додати 0,1 мл 0,5% розчину хлориду кальцію.
3. Пробірки тримати над полум'ям до першого закіпання. Охолодити.
4. Дивитись на світлі: якщо пластівців немає, додати ще 0,1 мл розчину хлориду кальцію і знову кип'ятити. Процедуру повторювати поки не випадають пластівці.

Результати оцінювати, підраховуючи загальну кількість хлориду кальцію, що пішла на реакцію.

Нормальні значення: 0,4 - 0,5 мл хлориду кальцію.

Література: Лабораторные методы исследования в клинике / Под редакцией В.В. Меньшикова. - М.: Медицина, 1987. - 364 с.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ЛАКТАТДЕГІДРОГЕНАЗИ В СИРОВАТЦІ КРОВІ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Основається на тому, що лактатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.27) каталізує окиснення лактату в піруват при одночасному перетворенні окисленого нікотинамідаденін-динуклеотида (НАД) у відновлену (НАДН). НАДН за допомогою переносника N-метилфеназонійметилсульфата відновлює окислений тетразолієвий фіолетовий в червоний формазан. Активність ферменту визначають фотометрично по кількості формазану, що утворився. Одночасно з визначенням загальної активності ферменту в сироватці крові можна визначити долю фермента, стабільного до дії солей міді, що характерно переважно для ізоферменту серцевої фракції [Білош А., 1966].

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

- Пробірки хімічні, ГОСТ 25336-82
- Циліндри мірні місткістю 50, 100 мл, ГОСТ 1770-74
- Пробірки для пробірок поліетиленові ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669-83
- Шетка скляна градуйована місткістю 2, 5 мл, 2-й клас, ГОСТ 20292-74
- Бюбки мірні місткістю 50, 250, 500, 1000 мл, ГОСТ 1770-74
- Стерилізатор тип СОС пр.-26-2-000, ТУ 23-1894.003-90
- Холодильник побутовий, ТУ 84-89
- Спектрофотометр СФ - 46 (Ломо, Росія), ТУ 3-3.1841-84
- Термостат ТС-80, ТУ 64-1-1317-80

РЕАКТИВИ

Склад набору:

- Буферний розчин - трис-буфер, 1 моль/л, містить неіоногенний детергент та граальний фільтр.
 - Субстрат I - розчин літію лактату 0,2 моль/л.
 - Субстрат II - розчин літію лактату 0,02 моль/л в розчині сечовини 1 моль/л.
 - Розчин порівняння - розчин комплексона III - 5,4 ммоль/л в розчині солю оксалату I, 1·10 моль/л.
 - Нікотинамідаденін-динуклеотид (НАД)
 - Реактив - наважка 153 мг.
 - Лиофілізований еталон.
- Набір зберігати в темному холодному місці при температурі від 0 до 5°C.

РОЗЧИНИ

1. Розчин реактиву. В 30 мл бідистильованої води розчинити 15 г реактиву. Розчин зберігати в холодному (від 0 до +5°C) темному місці більше 2 тижнів.
2. Розчин НАД. В 1 мл бідистильованої води розчинити 33 мг НАД. Для отримання робочого розчину додати 5,5 мл приготованого розчину. Розчин готувати кожний день, зберігати в холодильнику.
3. Еталонний розчин. Ліофілізований еталон розчинити в 1 мл бідистильованої води. Зберігати в холодильнику.
4. Соляна кислота 0,1 моль/л. Концентровану соляну кислоту (8,6 моль/л) розвести бідистильованою водою в мірній колбі місткістю 1000 мл.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

Для аналізу використовують сироватку крові. При визначенні загальної активності ферменту і частки стабільного до дії сечовини ферменту аналіз необхідно проводити в суворій послідовності (табл. 1). Якщо визначати тільки загальну активність ферменту, то слід уникати визначення в пробірці № 2. Розчини в пробірках № 4 і 5 вимірювати тільки 1 раз для всієї серії.

Таблиця 1

Послідовність проведення аналізу

Компоненти	Об'єм компонентів в пробірках, мл				
	1	2	3	4	5
1	2	3	4	5	6
Буферний р-н	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Субстрат I	0,5	-	-	0,5	-
Субстрат II	-	0,5	-	-	-
Розчин порівняння	-	-	0,5	-	0,5
Сироватка крові	0,05	0,05	0,05	-	-
Еталонний розчин	-	-	-	0,05	0,05
Перемішати і прогріти 10 хв при 37° С					
Робочий р-н реактиву	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Перемішати і знову прогріти 10 хв при 37° С					
Соляна кислота	3	3	3	3	3

Проби перемішати і виміряти оптичну густина на СФ-46 проти дистильованої води при довжині хвилі 510 нм в кюветі з товщиною шару рідини 10 мм.

Загальну активність ферменту розрахувати по формулі:

$$X = \frac{E(1) - E(3)}{E(4) - E(5)} \times Q \text{ де,}$$

X - загальна активність лактатдегідрогенази в сироватці крові, Е/л; E(1), E(3), E(5) - оптична густина відповідних проб; Q - активність ліофілізованого еталону,

ферменту, стабільного до дії сечовини, визначати по формулі:

$E(2) - E(3)$

$X = \frac{\dots}{\dots} \times 100 \text{ де,}$

$E(1) - E(3)$

X - дія активності лактатдегідрогенази в сироватці крові, стабільної до сечовини, Е/л; E(1), E(2), E(3) - оптична густина відповідних проб; 100 - коефіцієнт перерахунку.

Нормальні величини: загальна активність ферменту складає 50 – 100 од. дія ферменту, стабільного до дії сечовини - 25-45 %. (Дані по активності сироватки людини).

Література: Babson A.L., Phillips G.E. A rapid colorimetric assay for serum lactate dehydrogenase // Clin. chim. Acta.-1965.-Vol. 12.- P. 210-215.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА

ВІЗНАЧЕННЯ ФОСФОЛІПІДІВ І ПЕРЕКИСІВ

ЛІПІДІВ МЕМБРАН ЕРИТРОЦИТІВ МЕТОДОМ ТСХ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Ліпиди, екстраговані з мембран еритроцитів методом Блайя і Дайера, розподіляються в тонких прошарках силікагелю на скляних пластинках за допомогою суміші: для фосфоліпідів - хлороформ-метанол-вода (14:6:1) або (65:25:4); хлороформ-метанол-концентрований аміак (75:22:5). Колір виявляється в парах йоду або шляхом спалювання.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

- 1. Центрифуга ОПН-3 УХЛ 4.2, ТУ 5-375-42-60-76
- 2. Ротаційний вакуумний випарювач
- 3. Скляні фотопластини 9x12 см
- 4. Сухожарова шафа 2В-151, ТУ 64-1-1111-72
- 5. Електрофотометр СФ-46, (Ломо, Росія), ТУ 3-3. 1841-84
- 6. Інсталирний фільтр
- 7. Терези електронні ВЛ Е – 134, ГОСТ 24104-88
- 8. Колба мірна місткістю 1000 мл, ГОСТ 1770-74
- 9. рН-метр-мілівольтметр, тип рН-150, ГОСТ 22261-82.

РЕАКТИВИ

- 1. Орто-пропанол, ГОСТ 6994-78
- 2. Хлороформ, кваліфікація "ч" ТУ 6-09-06-800-76
- 3. Силікагель ("Сhemapol", Merck)
- 4. Метанол, ГОСТ 6995-77
- 5. Аміак водний, кваліфікація "чда" ГОСТ 3760
- 6. Петролейний ефір, кваліфікація "ч" ГОСТ 11992-66

7. Ефір для наркозу стабілізований (м. Шостка, Україна)
8. Льодяна оцтова кислота, кваліфікація "ч" ГОСТ 61-75
9. Йодид калію, кваліфікація "чда" ГОСТ 4232-74
10. Кислота сірчана концентрована, кваліфікація "чда" ГОСТ 4204-74
11. Хлорид натрію, кваліфікація "ч" ТУ 6-09-5222-85
12. Цинковий пил, кваліфікація "ч" ГОСТ 4328-77
13. Крохмаль, кваліфікація "ч" ГОСТ 10163-76
14. Натрію хлорид, кваліфікація "чда", ГОСТ 4328-77
15. Натрій фосфорнокислий двозаміщений, кваліфікація "чда" ТУ 64-01-001-77
- Калій фосфорнокислий однозаміщений, кваліфікація "чда", ГОСТ 4191-77

РОЗЧИНИ

1. 0,9% фізіологічний розчин: наважку хлориду натрію масою 0,9 г зважити з точністю 0,005 г, розмішати в 91 мл дистильованої води. Зберігати в холодильнику при температурі +4°C протягом 2-х місяців.
2. Ізотонічний фосфатний буфер, рН 7,4: в мірну колбу місткістю 1000 мл кількісно перенести послідовно, кожний раз розмішуючи, наважки реактивів, зважених з точністю до 0,005 г: 7,82 г хлориду натрію, 1,17 г фосфорнокислого натрію двозаміщеного, 0,25 г калію фосфорнокислого однозаміщеного. Перемішати і недоливаючи дистильовану воду до міри на мірній колбі, перевірити рН розчину. В разі необхідності довести до значення 7,4, додаючи обережно невеликі порції 1 N соляну кислоту. Зберігати у холодильнику при температурі +4°C протягом двох тижнів.
3. Розчин крохмалю: наважку розчиненого крохмалю масою 1 г, зважити з точністю 0,005 г, змішати з 5 мл дистильованої води до отримання однородної маси, суміш влити при постійному розмішуванні у 100 мл киплячої дистильованої води. Кип'ятити протягом 2 хв до отримання злегка опалесцируючої рідини. Зберігати протягом 3 діб.
4. 10% розчин йодиду калію: наважку йодиду калію 10 г, зважену з точністю 0,005 г, розчинити у 90 мл дистильованій воді, перемішати. По 10 мл 10% розчину йодиду калію змішати з 40 мл оцтової кислоти і 100 мг цинкового пилу. Розчин профільтрувати. Готується для використання.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. Методика отримання мембран еритроцитів:
 - а) Еритроцити двічі відмити ізотонічним фосфатним буфером рН 7,4
 - б) гемолізувати еритроцити дистильованою водою в співвідношенні 1:1 і один раз відмити струмою, що утворилася 0,9% розчином хлориду натрію
 - в) гемолізувати еритроцити дистильованою водою в співвідношенні 1:50 і двічі відмити струмою 0,9% розчином хлориду натрію.

РОЗЧИНИ

1. 0,9% фізіологічний розчин (рН 7,4): наважку хлориду натрію масою 0,9 г зважити з точністю 0,005 г, розмішати в 91 мл дистильованої води. 0,9% фізіологічний розчин довести фосфатною сумішшю до рН 7,4.

Примітка: розчин по своїй осмотичній концентрації відповідає 10% розчину хлориду натрію. Розчин стійкий на протязі кількох місяців, зберігати у добре закритій склянці. Цей розчин є основним.

2. Фосфатна суміш: наважки, взяті з точністю 0,005 г, хлориду натрію 180,00 г, натрію фосфату однозаміщеного 27,31 г, натрію фосфату двозаміщеного 4,86 г помістити у мірну колбу 2000 мл, додати дистильованої води до мітки, перемішати. Зберігати у холодильнику при температурі + 4°C протягом 2-х тижнів.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. Основний розчин (0,9% розчин хлориду натрію, рН 7,4) розбавити попередньо водою 1:10. Приготувати розведення, відповідно 0,85, 0,65, 0,60, 0,55, 0,50, 0,45, 0,40, 0,35, 0,30, 0,20, і 0,10%. Корисно включити і проміжні розведення 0,475 і 0,525%. Приготувати по 50 мл кожного розведення. Зберігати у холодильнику при температурі + 4°C, термін зберігання необмежений

2. В серію пробірок помістити по 5 мл кожного розведення. В кожну пробірку додати по 0,05 мл гепаринізованої або дефібрированої крові, перемішати і залишити стояти при кімнатній температурі не менш 30 хв. Центрифувати при 2000 об/хв 5 хв.

3. Забарвлену рідину в пробірці з концентрацією 0,1% визначати на КФ при зеленому світлофільтрі 532 нм; компенсаційною рідиною надосадова рідина в пробірці з концентрацією 0,85%. Отримана екстинкція відповідає 100% гемолізу. При цих же умовах визначати коефіцієнт екстинкції в інших пробірках, порівнюють їх з коефіцієнтом екстинкції 100% гемолізу по простому трійному правилу отримують гемолізу в кожній пробірці.

Нормальні показники:

0,55% хлорид натрію	0% гемолізу
0,50% хлорид натрію	5% гемолізу
0,45% хлорид натрію	45% гемолізу 5
0,40% хлорид натрію	90% гемолізу 50
0,35% хлорид натрію	99% гемолізу 90
0,30% хлорид натрію	100% гемолізу 97

Примітка: Гепаринізовану кров отримувати наливаючи 5 мл венозної крові в пробірку, яка містить 1 мг висушеного гепарину (0,25 мл 400 мг гепарину нагрівають при температурі + 37°C до сухого).

Концентрація хлориду натрію	Кількість 10 % Хлориду натрію (мл)	Кількість води	Кількість води	Кількість води
0,85 %	8,5	До 100	Всього 100	17 до 200
0,75 %	7,5	До 100	Всього 100	15 до 200
0,65 %	6,5	До 100	Всього 100	13 до 200
0,60 %	6,0	До 100	Всього 100	12 до 200
0,55 %	5,5	До 100	Всього 100	11 до 200
0,525 %	5,25	До 100	Всього 100	10,5 до 200
0,50 %	5,0	До 100	Всього 100	10 до 200
0,475 %	4,75	До 100	Всього 100	9,5 до 200
0,45 %	4,5	До 100	Всього 100	9 до 200
0,40 %	4,0	До 100	Всього 100	8 до 200
0,35 %	3,5	До 100	Всього 100	7 до 200
0,30 %	3,0	До 100	Всього 100	6 до 200
0,20 %	2,0	До 100	Всього 100	4 до 200
0,10 %	1,0	До 100	Всього 100	2 до 200

Література: Предтеченский В.Е. Руководство по клиническим и лабораторным исследованиям. - М.: Медицина, 1960. - с. 96.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ КИСЛОТНОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ЕРИТРОЦИТІВ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Еритроцити пошкоджуються дією соляної кислоти, в результаті чого гемоглобін надходить в розчин. Вимірюють швидкість процесу по встановленню концентрації гемоглобіну в розчині.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

Спектрометр фотоелектричний концентраційний КФК-2-УХЛ 4.2. ТУ 3-766-82

Шпатель скляні місткістю 0,02, 10 мл. ГОСТ 20292-74

Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74

Хронометр тип СОС пр-26-2-000, ТУ 23-1894. 00-90

РЕАКТИВИ

Хлорид натрію, кваліфікація "чда" ГОСТ 4233-77

Кислота соляна концентрована, кваліфікація "чда" ГОСТ 3118-77

РОЗЧИНИ

0,10% розчин хлориду натрію: наважку хлориду натрію масою 0,9 г зважити точно і розчинити в 91 мл дистильованої води, перемішати.

2. Розчин 0,1 н соляної кислоти (готувати із стандарт-титрів): В мірколбу місткістю 1000 мл перенести вміст ампули стандарт- титра соляної кислоти (0,1 н). Ампулу добре промити дистильованою водою, зібрати промивні води в мірну колбу. Вміст колби перемішати, долити розчин дистильованою водою до мітки на колбі та ще раз добре перемішати. Розчин стійкий, зберігати у склянці з притертою пробкою при кімнатній температурі.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. 0,02 мл крові змішати з 5 мл 0,9% розчином хлориду натрію. Фотометрувати проби при довжині хвилі 540 нм та товщині кювети 10 мм. Додати 0,04 мл 0,1 н розчину соляної кислоти, перемішати.
2. Кожні 30 секунд знімати показання екстинкції до повтору однакових показань тричі.
3. Побудувати калібрувальний графік. По осі ординат відкласти величини різниці екстинкції між попереднім і наступним замірами, виражені в процентах, по осі абсцис - час в секундах.

При аналізі калібрувального графіку кислотного гемолізу еритроцитів відмічати загальний час процесу гемоліза та висоту максимуму гемолізу.

Література: Гительзон И.И., Терсков И.А. Эритрограммы как метод клинического исследования крови.- Красноярск, 1959.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ МЕХАНІЧНОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ЕРИТРОЦИТІВ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Еритроцити травмуються механічно за допомогою скляних намистинок на залізного магнітного стержня, до їх руйнування і виходу гемоглобіну в плазму.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Плоскодонна конічна колба місткістю 35 мл, діаметр дна 27 мм.
2. Запаяний в поліетилен магнітний стержень довжиною 20 мм і діаметром 6 мм
3. 10 скляних намистинок діаметром 3 мм
4. Магнітна мішалка
5. Центрифуга ОПН-ЗУХЛ 4.2 ТУ 5-375-42-60-76
6. Колориметр фотоелектричний концентраційний КФК-2-УХЛ 4.2 ТУ 3-3.1766-82

РЕАКТИВИ

Хлорид натрію, кваліфікація "чда" ГОСТ 4233-77

РОЗЧИНИ

0,9% розчин хлориду натрію: наважку хлориду натрію масою 0,9 г зважити точно до 0,005 г, розчинити в 91 мл дистильованої води, перемішати.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

- 1 0,2 мл цитратної крові розвести 0,9% розчином хлориду натрію до 10 мл.
- 2 Помістити суміш в плоскодонну конічну колбу.
- 3 Колбу покласти запаяний в поліетилен залізний магнітний стержень та 10 скляних намистинок діаметром 3 мм.
- 4 Колбу поставити на магнітну мішалку при 1500 об/хв на 30 хв.
- 5 Після цього проби центрифугувати при 1500 об/хв 15 хв.
- 6 Отриманий супернатант фотометрувати при 532 нм в кюветях 10 мм оптичною.
- 7 Контроль на 100% гемоліз отримувати шляхом розведення 0,2 мл цитратної крові дистильованою водою до 10 мл.
- 8 Враховувати процент гемолізу еритроцитів в пробі, що свідчить про певну стійкість еритроцитарних мембран.

Література: Shen S., Castle W., Fleming R.M. Clinical observations on increased mechanical fragility of erythrocytes. - Science. - 1944. - Vol.100. - P. 387-389.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ β - ТА ПРЕ- β - ЛІПОПРОТЕЇДІВ В СИРОВАТЦІ КРОВІ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Атерогенні ліпопротеїди при взаємодії з гепаринном та хлоридом кальцію у розчині утворюють нерозчинні комплекси, що розсіюють світло пропорційно кількості утворених комплексів; вимірюючи ступінь розсіювання світла можна судити про концентрацію ліпопротеїдів.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

- Детектор автоматичний поршневий медичний А-2, ТУ 64-1-2828-8
- Детектор піпетковий ПІ-0,2, ТУ 64-1-3329-81
- Ензимометр фотоелектричний концентраційний КФК-2-УХЛ. 4.2, ТУ 64-1-1766-82
- Секундомір тип СОС пр. – 26-2-00. ТУ 23-1894.003-90
- Терези торсіонні ВТ-500, ТУ 64-1-990-81
- Колби мірні місткістю 100, 250, 1000 мл, ГОСТ 1770-74
- Шпетка скляна градуйована місткістю 1,0 мл, 2-й клас, ГОСТ 20292-74
- Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74

9. Циліндр мірний місткістю 25 мл, ГОСТ 1770-74

10. Штативи для пробірок поліетиленові ШПП 02-40, ТУ 64-1-266

РЕАКТИВИ

1. Гепарин для ін'єкцій, 5000 МО, (ВАТ Белмедпрепарати)

2. Кальцію хлорид, кваліфікація «чда», ГОСТ 4460-77.

РОЗЧИННИ

1. Розчин хлориду кальцію, концентрація 0,025 М: наважку кальцію хлориду масою 0,694 г, зважену з точністю до 0,001 г, кількісно перенести в мірну колбу місткістю 250 мл, долити дистильовану воду до об'єму приблизно 200 мл, старанно перемішати до повного розчинення хлориду кальцію, довести дистильованою водою до мітки та знов старанно перемішати;

2. Розчин гепарину, 1250 МО. До 1 мл розчину гепарину, що містить 1250 МО, долити 3 мл дистильованої води, ретельно перемішати.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. В поліетиленовий штатив для пробірок помістити центрифужні пробірки та пронумерувати їх.

2. В кожену пробірку налити 2 мл 0,025 М розчину хлориду кальцію.

3. За допомогою піпеткового дозатора внести дослідну сироватку об'ємом 0,2 мл.

4. Розчин та сироватку в пробірці перемішати і виміряти оптичну густину на КФК-2 в кюветі з довжиною оптичного шляху 5 мм при довжині хвилі 700 нм проти води (D_1).

5. Розчин із кювети злити в ту ж центрифужну пробірку, долити водою допомогою скляної градуйованої піпетки 0,04 мл розчину гепарину. Старанно перемішати.

6. Рівно через 4 хв (час визначати за допомогою секундоміра) від моменту приливання розчину гепарину знову визначити оптичну густину (D_2).

7. Концентрацію в сироватці β - і пре- β -ліпопротеїдів визначати за формулою

$$C = (D_2 - D_1) \cdot 11,65, \text{ де}$$

C – концентрація β - і пре- β -ліпопротеїдів, г/л;

11,65 – коефіцієнт перерахунку з одиниць оптичної густини в г/л.

Нормальні значення: В сироватці крові здорової людини концентрація β - і пре- β -ліпопротеїдів становить 5,0 – 7,0 г/л.

Література: Функциональные методы исследования в эндокринологии. К.: Здоров'я, 1981. – С. 76-77.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ТІМОЛОВОЇ ПРОБИ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

В цитраткові β -глобуліни, γ -глобуліни і ліпопротеїни осаджуються при 7,55 тімолувим реактивом. В залежності від кількості і взаємного співвідношення окремих білкових фракцій при реакції виникає помутніння, інтенсивність якого вимірюють турбідиметрично.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Пробірки хімічні, ГОСТ 25336-82
2. Циліндри мірні місткістю 50, 100 мл, ГОСТ 1770-74
3. Піпетки для пробірок поліетиленові ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669-83
4. Піпетка скляна градуйована місткістю 2, 5 мл, 2-й клас, ГОСТ 20292-74
5. Колба мірна місткістю 50, 250, 500, 1000 мл, ГОСТ 1770-74
6. Піпетор піпетковий ПІ-0,05, ТУ 64-1-3329-81
7. Колориметр медичний фотоелектричний МКМФ-1, ТУ 2Т 400 008
8. Холодильник побутовий, ТУ 84-89

РЕАКТИВИ

Набір реагентів:

1. Концентрований розчин тімолу: тімол 6,66 моль/л в буфері: трис-фосфатна кислота, рН 7,55
2. Калибрувальний розчин I: сірчана кислота 2,5 моль/л
3. Калибрувальний розчин II: барій хлористий 48 ммоль/л
4. 0,9% розчин натрію хлористого

РОЗЧИНИ

1. Приготування тімолу реактиву. В мірну колбу місткістю 500 мл влити близько 400 мл дистильованої води і при постійному перемішуванні поступово додати 7,5 мл реактиву 1. Носик піпетки повинен бути занурений у воду в колбі. Розчин доповнити дистильованою водою до мітки і перемішати протягом 10 хв. Реактив зберігати при кімнатній температурі. Стійкий декілька місяців.
2. Розчин порівняння I. В мірну колбу місткістю 250 мл піпеткою внести реактив 2, додати охоложену до температури $+8^{\circ}\text{C}$ дистильовану воду до мітки і перемішати.
3. Розчин порівняння II. В мірну колбу місткістю 50 мл піпеткою помістити 5 мл реактиву 3 і додати до мітки розчином порівняння I, охолодженим до температури $+10^{\circ}\text{C}$. Вміст колби старанно перемішати.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

Вимірювання проводять на мікроколориметрі при довжині хвилі 600 нм, кювета 10 мм.

Відмірити (мл)	Проба	Контрольний розчин 1	Контрольний розчин 2
Сироватка крові	0,05	-	0,05
Тімоловий реактив	3,00	3,00	-
0,9 % розчин хлориду натрію	-	0,05	3,00

Перемішати і залишити стояти точно 30 хв при кімнатній температурі. Виміряти оптичну густину проби проти контрольного розчину 1 або проти контрольного розчину 2, якщо сироватка хільозна. Важливі співвідношення величин між собою, ніж їх абсолютні величини, тому користуються контрольним розчином 2. Безпосередньо перед заміром розчин знову перемішати.

Калібровка. Із розчинів порівняння I і II приготувати розчини помутніння, які відповідають (5-20) одиницям помутніння по Shantl Hoagland (од. S-H), відповідно таблиці, що приведена нижче.

№ проби	Розчин порівняння I	Розчин порівняння II	Одиниці помутніння S-H
1	4,5	1,5	5
2	3,00	3,00	10
3	1,5	4,5	15
4	-	6,00	20

В пробірках змішати розчин 1 і розчин 2, точно через 30 хв вмішати пробірок старанно перемішати, після чого виміряти оптичну густину проти дистильованої води.

Виміри проводять при такій же довжині хвилі, як при вимірюванні проби.

Показники екстинкції:

5 од. - 0,085

10 од. - 0,170

15 од. - 0,260

20 од. - 0,340

Розрахунок:

од. помутніння = 20:0,34 x E проби = 58,8 x E проби.

Нормальні значення: (0-4) од. S-H

4.4. риничні величини (4-5) од. S-N

4.5. іологічні величини більше 5 од. S-N

Література: N.F. Mac Lagan: Brit. J. Exper. Path. 23, 234 (1944). 2. V. Chromy,
H. Makova, J. Tovarek Biochem. clin. bohemslov. 3, 115 (1974).

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ БІЛКУ ЗА ДОПОМОГОЮ КУМАСІ БРИЛАНТОВОГО БЛАКИТНОГО

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Бриліантовий блакитний утворює з альбуміном забарвлений комплекс.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Пробірки хімічні, ГОСТ 25336-82
2. Циліндри мірні місткістю 50, 100 мл, ГОСТ 1770-74
3. Піпетки для пробірок поліетиленові ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669-83
4. Піпетка скляна градуйована місткістю 2, 5 мл 2-й клас, ГОСТ 20292-74
5. Банка мірна місткістю 1000 мл, ГОСТ 1770-74
6. Терези електронні ВЛ Е-134, 2-й клас, ГОСТ 104-88
7. Пластик для імунологічних реакцій, ТУ 64-2-278-79
8. Колориметр фотоелектричний концентраційний КФК-2-УХЛ 4.2, ТУ 3-1766-82

РЕАКТИВИ

1. Барвник кумасі бриліантовий блакитний G-250, ("Sigma", США)
2. Спирт етиловий 96°, ГОСТ 5962-67
3. Натрію хлорид, кваліфікація «чда», ГОСТ 4233-77
4. Альбумін, ГОСТ 8115-73
5. Кислота фосфорна концентрована, кваліфікація «чда», ГОСТ 6652-80

РОЗЧИНИ

1. Реагент - розчин барвника: 100 мг кумасі бриліантового блакитного G-250 розчинити в 50 мл 95% етанолу. До цього розчину додати 100 мл фосфорної кислоти (85%) і довести до 1 л дистильованою водою. Профільтрувати розчин. Зберігати при 20°C на протязі 2 тижнів.
2. Розчин хлориду натрію, концентрація 0,9% (0,15 M): в мірну колбу місткістю 1000 мл перенести 9,0 г хлориду натрію, зваженого на терезах з точністю до 0,1 г, додати дистильованої води та перемішати до повного розчинення хлориду натрію; довести розчин дистильованою водою до мітки ще раз ретельно перемішати; розчин зберігати в холодильнику протягом місяців при температурі +8 +10°C.
3. Стандартний розчин альбуміну 10%.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. Розчин білку (10-100 мкг) помістити в хімічну пробірку, розбавити 0,1 мл 0,9% розчином хлориду натрію.
2. Додати 5 мл розчину барвника і перемішати.
3. Через 2 хв починати вимірювання поглинання при 595 нм на контрольному розчині. Вимірювання продовжувати 1 годину.

Можна працювати з пробами, що містять 1-10 мкг в 0,1 мл 0,9% розчину хлориду натрію; при цьому додати 1 мл барвника. Вимірювання проводити в кюветі об'ємом 1 мл.

МІКРОМЕТОД БРЕДФОРДА

Зразки білку по 100 мкл (наприклад, фракції елюата з ВЕРХІВНОГО розчинні білків-стандартів помістити в лунки мікропланшету і додати 200 мкл розчину барвника, розвести водою (1:5). Струсити і через 10 хв колориметрувати при 595 нм.

Література: Bredford M.M. Anal Biochem 72, 248254(1976) 1.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ НЕОРГАНІЧНОГО ФОСФОРУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ З МАЛАХІТОВИМ ЗЕЛЕНИМ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Неорганічний фосфор реагує з молібдатом амонію з утворенням фосфомолібдатного комплексу. Останній, при взаємодії з барвником малахітовим зеленим, дає зелене забарвлення.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Піпетки скляні градуйовані місткістю 1 мл 2-й клас, ГОСТ 20292-74
2. Пробірки хімічні, ГОСТ 25336-82
3. Колби мірні місткістю 50, 100 мл, ГОСТ 1770-74
4. Терези електронні ВЛ Е-134, ГОСТ 104-88
5. Мікроколориметр медичний фотоелектричний МКМФ-1, ТУ 2Т 1.540-11

РЕАКТИВИ (НА 100 ВИЗНАЧЕНЬ)

1. Малахітовий зелений - 100 мл
2. Амоній молібденовокислий - 35 мл
3. Стандартний розчин фосфору - 2 мкг/мл - 5 мл
4. Хлорид натрію, кваліфікація «чда» ГОСТ 4233-77

РОЗЧИНИ

Приготування робочого реагенту: 1 об'єм розчину молібденовокислого зеленого змішати з 3 об'ємами малахітового зеленого. Зберігати при температурі 4°C 2 тижні.

Виготовлення розчину хлориду натрію концентрацією 0,9% (0,15 M): в мірну колбу місткістю 100 мл перенести наважку хлориду натрію 9,0 г, додати з точністю до 0,1 г, долити дистильованої води та перемішати до повного розчинення хлориду натрію; довести розчин дистильованою водою до мітки та ще раз ретельно перемішати. Розчин зберігати в холодильнику протягом 2 місяців при температурі $+8 - +10^{\circ}\text{C}$.

Виготовлення водного розчину малахітового зеленого 0,045%: в мірну колбу місткістю 100 мл перенести 0,045 г малахітового зеленого, додати з точністю до 0,001 г, долити дистильованої води та перемішати до повного розчинення реактиву; довести розчин дистильованою водою до мітки та ще раз ретельно перемішати. Розчин зберігати в холодильнику.

Виготовлення водного розчину амонію молібденовокислого 4,2%: в мірну колбу місткістю 100 мл перенести 4,2 г амонію молібденовокислого, додати з точністю до 0,001 г, долити дистильованої води та перемішати до повного розчинення реактиву; довести розчин дистильованою водою до мітки та ще раз ретельно перемішати. Розчин зберігати в холодильнику.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

Підготовка сироватки. До 0,1 мл сироватки крові додати 3,9 мл 0,9% розчину хлориду натрію. До 0,25 мл розведеної проби, що досліджується, додати реактив; суміш перемішати і витримати 20 хв при кімнатній температурі.

Одночасно провести визначення контролю: до 0,25 мл дистильованої води додати 1 мл реагенту.

Визначення стандартної проби: до 0,25 мл розчину стандарту додати 1 мл реагенту.

Вимір результатів проводити на мікрофотоелектроколориметрі МКМФ-10 при довжині хвилі 610 нм, кюветі 0,5 см, проти контрольної проби.

Визначення вмісту неорганічного фосфору в сироватці проводити по формулі:

$$\frac{E_{\text{досл.}} \times 2 \text{ мкг/мл} \times 40}{E_{\text{ст}}}$$

(мг/л)

Нормальні величини: чоловіки 20-46 мг/л
жінки 13-61 мг/л
діти 40-60 мг/л

Література: 1. Лабораторные методы исследования в клинике / Под ред. Мещаникова В.В. - М.: Медицина, 1987. - С. 270 - 273. - 2. Hess H.H. Derr I.E. Anal 1975, Vol. 63, P.7

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ СІАЛОВИХ КИСЛОТ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ЗА РЕАКЦІЄЮ З ОЦТОВО-СІРЧАНОКИСЛИМ РЕАКТИВОМ (РЕАКЦІЯ ГЕССА)

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Сіалові кислоти, які представляють собою ацильовані пом'якшені нейрамінової кислоти, звільняються в результаті гідролізу сироватковими глікопротеїдів і утворюють забарвлену сполуку при нагріванні з оцтово-сірчанокислим реактивом.

МАТЕРІАЛИ І ОБЛАДНАННЯ

1. Колориметр фотоелектричний концентраційний КФК-2-УХЛ 4.2, ТУ 3.1766-82
2. Секундомір тип СОС пр. – 26-2-000, ТУ 23-1894. 003-90
3. Терези лабораторні ВЛР-200, 2-й клас, ГОСТ 19491-74
4. Терези електронні ВЛ Е –134, 2-й клас, ГОСТ 104-88
5. Баня водяна
6. Лійка скляна діаметром 50 – 70 мм, ГОСТ 1770-74
7. Дозатор піпетковий ПІ-100, ПІ-1000, ТУ 64-1-3329-81
8. Колба мірна місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74
9. Піпетка скляна градуйована місткістю 5 мл, 2-й клас, ГОСТ 2029-74
10. Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74
11. Центрифуга лабораторна ОПН-3 УХЛ 4.2 ТУ 5.375-4260-76;
12. Циліндри мірні місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74
13. Штативи для пробірок поліетиленові ШПП 02-40 ТУ 64-1-2669-81

РЕАКТИВИ

1. Кислота N-ацетілнейрамінова, (I CN Biomedicals I nc)
2. Кислота оцтова льодяна, кваліфікація «чда» ГОСТ 61-75
3. Кислота сірчана концентрована, кваліфікація «чда» ГОСТ 4204-77
4. Кислота трихлороцтова, кваліфікація «чда» ТУ 6-09-1926-77

РОЗЧИНИ

1. Розчин калібратора – водний розчин N-ацетілнейрамінової кислоти концентрація 0,5 мг/мл. Наважку кристалічної N-ацетілнейрамінової кислоти масою 0,1 г, зважену з точністю 0,0001 г, кількісно перенести в мірну колбу місткістю 100 мл, розчинити в дистильованій воді, довести об'єм розчину до мітки на мірній колбі. Зберігати в морозильній камері при температурі –10°С

Нормальні величини: концентрація сіалових кислот в сироватці крові виражається в мг/л N-ацетілнейрамінової кислоти і коливається в межах від 620 до 730 мг/л.

Література: Методические указания по применению унифицированных клинических лабораторных методов исследований / Под ред. проф. И. В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1973. – С. 96 – 97.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА

ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ПОЛІПЕПТИДІВ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Визначення поліпептидів базується на здатності фосфорно-вольфрамової кислоти осаджувати як білки так і поліпептиди, на відміну від трихлороцтової кислоти, яка здатна осаджувати лише білки.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Дозатори піпеткові ПІ-2, ПІ-200, ПІ-100, ПІ-100, ТУ 64-1-3329-81
2. Терези лабораторні ВЛР-200, 2-й клас, ГОСТ 19491-74
3. Терези електронні ВЛ Е-134, ГОСТ 104-88
4. Колби мірні місткістю 50 мл, ГОСТ 1770-74
5. Папір фільтрувальний, ГОСТ 12026-76
6. Піпетки скляні градуйовані місткістю 1, 2, 5, 10 мл, 2-й клас, ГОСТ 20292-74
7. Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74
8. Плита електрична з закритою спіраллю, тип ЕПШ-1-0,8, ГОСТ 14919-81
9. Стакани хімічні місткістю 50, 100 мл, ГОСТ 1770-74
10. Мірний циліндр місткістю 100 мл, ГОСТ 20292-74
11. Колба Ерлінмеєра з термостійкого скла місткістю 50 мл, ГОСТ 10394-74
12. Центрифуга лабораторна ОПН-3 УХЛ 4.2, ТУ 5.375-4260-76
14. Папір індикаторний універсальний, ТУ 6-09-1181-76
15. Штативи для пробірок поліетиленові ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669-83
16. Колориметр фотоелектричний концентраційний КФК-2-УХЛ 4.2, ТУ 3-3. 1766-82
17. Вакуум-насос Комовського.

РЕАКТИВИ

1. Кислота трихлороцтова (ТХО), кваліфікація «чда» ТУ 6-09-1926-77
2. Кислота фосфорновольфрамова, кваліфікація «хч» ТУ 26-01-553
3. Кислота сірчана концентрована, кваліфікація «чда» ГОСТ 4204-77
4. Пероксид водню (пергідроль), ГОСТ 10929-765.
5. Сульфат амонію, кваліфікація «чда» ГОСТ 3769-78
6. Гідроксид натрію, кваліфікація «хч» ГОСТ 4328-77
7. Гідроксид калію, кваліфікація «хч», «Lachema»

Примітка. При підготовці до випробування використовувати дистильовану воду, вільну від аміаку. При наявності аміаку його видаляють кип'ятінням на протязі 30 хв, додаючи вуглекислий натрій (1 г вуглекислого натрію на 1000 мл води).

На аналітичних терезах зважити 1,0 г досліджуваного матеріалу (або 1 мл для рідин) з точністю до 0,0001 г. Зважування проводити на центрифужній пробірці. В цю ж пробірку додати 1 мл 30% розчину трихлороцтової кислоти.

У другу центрифужну пробірку теж зважити вказану вище кількість досліджуваного матеріалу та додати 1 мл 3% розчину фосфорно-вольфрамової кислоти.

Обидві пробірки залишити на одну годину при кімнатній температурі, після чого центрифугувати 15 хв при 3000 об/хв.

1 мл центрифугату, відміреного за допомогою піпетки скляної з точністю до 0,01 мл, перенести в колбу Ерленмеєра місткістю 50 мл. Сюди ж прилити 1 мл концентрованої сірчаної кислоти, перемішати так щоб суміш не потрапляла на стінки колби, та поставити на розігріту електричну плитку з азбестовою сіткою. Нагрівати суміш на протязі 30 хв, після чого колби охолодити та додати в них по 0,2 мл 30% розчину пероксиду водню, відміряного з точністю до 0,01 мл. Знову помістити колби на розігріту електричну плитку та нагріти на протязі 10 хв до повного зникнення кольору суміші. Якщо колір ще залишився, то колби знову охолодити, додати в них ще по 0,2 мл 30% розчину пероксиду водню і нагріти ще на протязі 10 хвилин.

Охолоджений розчин, оброблений трихлороцтовою кислотою повинен мати кольору і повинен бути прозорим. Суміш, що була оброблена фосфорно-вольфрамовою кислотою містить осад від білого до слабко-блакитного кольору (який не заважає визначенню).

Охолоджену суміш кількісно перенести у мірну колбу місткістю 50 мл і довести після охолодження до мітки дистильованою водою та перемішати.

З колби відібрати 2 мл розчину, помістити його в іншу мірну колбу місткістю 50 мл та додати 10 мл дистильованої води. Надлишок сірчаної кислоти нейтралізувати 1 М розчином гідроксиду натрію до рН 7,5-8,0 користуючись універсальним індикаторним папером.

Після цього в мірну колбу долити дистильовану воду до об'єму приблизно 45 мл, додати за допомогою скляної піпетки 2 мл реактиву Несслера, довести дистильованою водою до мітки. Отриманий розчин колориметрувати при синьому світлофільтрі (400 нм) в кюветі з робочою межею 20 мм проти води.

Якщо розчин при підготовці до колориметрії мутніє то перед внесенням реактиву Несслера необхідно прилити 2 мл 50% розчину калію натрію артрату.

Обробка результатів:

Користуючись калібрувальним графіком знайти кількість азоту в пробі, що аналізується.

Розрахувати вміст пептидів в середовищі за формулою:

$$X = \left(\frac{a1}{m1} - \frac{a2}{m2} \right) \times 1,5625, \text{ де}$$

1) кількість азоту в пробі, що оброблена ТХО, знайдена за допомогою калібрувального графіку, мкг/мл;

2) кількість азоту в пробі, що оброблена фосфорно-вольфрамовою кислотою, знайдена за допомогою калібрувального графіку, мкг/мл

3) навіжка продукту для обробки ТХО, г;

4) навіжка продукту для обробки фосфорно-вольфрамовою кислотою, г;

1,5625 - коефіцієнт, що враховує розбавлення та перерахунок в грами.

Література: Руководство по лабораторным методам исследования / Под редакцией Смирновой Л.Г., Кост Е.А. - М.: Медгиз, 1950. - С. 155-195.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТРИПТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ СЛИНИ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Фермент трипсин, при взаємодії з казеїном, руйнує його, утворюючи продукти реакції, оптична густина яких в розчині пропорційна трипсину, що прореагував. Інгібітори слини здатні частково руйнувати трипсин. Рівниця між кількістю трипсину, введеного в реакцію, і кількістю трипсину, що прореагував з казеїном в присутності слини, дає кількість зруйнованого трипсином трипсину і характеризує активність слини по руйнуванню трипсину.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Центрифуга ОПН-3 УХЛ 4.2, ТУ 5-375-42-60-76
2. Термостат ТС-80, ТУ 64-1-1317-80
3. Дозатор піпетковий ПІ-200, ТУ 64-1-3329-81
4. Перези електронні ВЛ Е-134, 2-й клас, ГОСТ 104-88
5. Колби мірні місткістю 50, 100, 250, 1000 мл, ГОСТ 1770-74
6. Піпки скляні, ГОСТ 1770-74
7. Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74
8. Штативи для пробірок ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669-83;
9. Фільтрувальний папір, ГОСТ 12026-76
10. Піпетки скляні градуйовані місткістю 2, 5, 10 мл, ГОСТ 1770-74
11. Спектрофотометр СФ-46, (Ломо, Росія), ТУ 3-3.1841-84
12. рН-метр-мілівольтметр, тип рН-150, ГОСТ 22261-82

РЕАКТИВИ

1. Трис-(окси)-метиламінометану, кваліфікація «чда» ТУ 6-09-2477-77
2. Кислота соляна, стандарт-титри, 0,1 н, ТУ 6-09-2540-87
3. Натрію гідроксид, кваліфікація «чда», ГОСТ 4328-77
4. Натрію хлорид, кваліфікація «чда», ГОСТ 4233-77
5. Кислота трихлороцтова, кваліфікація «чда», ТУ 6-09-1926-77
6. Казеїн, ГОСТ 17626-81
7. Трипсин, ГОСТ 17635-86

РОЗЧИНИ

1. 10% розчин натрію гідроксиду. В хімічну колбу місткістю 1000 мл перенести 10 г натрію гідроксиду, зваженого з точністю до 0,01 г, прилити 90 мл дистильованої води, ретельно перемішати.
2. Розчин 0,1 н соляної кислоти. Готувати із стандарт-титрів. В мірну колбу місткістю 1000 мл перенести вміст ампули стандарт-титру соляної кислоти (0,1 н). Ампулу добре промити дистильованою водою збираючи промивні води в мірну колбу. Вміст колби перемішати, долити розчин дистильованою водою до мітки на колбі та ще раз добре перемішати. Розчин стійкий, зберігати у склянці з притертою пробкою при кімнатній температурі.
3. Розчин 0,0025 н соляної кислоти. Приготовлений розчин 0,1 н соляної кислоти розвести в 40 разів дистильованою водою.
4. Розчин трихлороцтової кислоти (розчин ТХО), концентрація 5%. Наважку ТХО масою 5 г, зважену з точністю 0,1 г, розчинити в 95 мл дистильованої води. Розчин стійкий.
5. Виготовлення розчину хлориду натрію концентрацією 0,9% (0,15 М). В мірну колбу місткістю 100 мл перенести 9,0 г хлориду натрію, зваженого з точністю до 0,1 г, долити дистильованої води та перемішати до повного розчинення хлориду натрію, довести розчин дистильованою водою до мітки та ще раз ретельно перемішати. Розчин зберігати в холодильнику протягом 2 місяців при температурі +8 - +10° С.
6. Розчин трис-буферу (рН 7,6) 0,1 М. До складу буферу входять такі компоненти: 50 мл 0,1 М трису (12,114 г трису розчинити в 100 мл дистильованої води), 3,85 мл 0,1 н соляної кислоти. Компоненти перенести в мірну колбу місткістю 100 мл і довести об'єм дистильованою водою до мітки. Перевірити рН середовища.
7. Розчин трис-буферу (рН 7,6) з добавкою кальцію. Наважку 0,0001 моль хлориду кальцію розчинити в 2 мл трис-буферу (розрахунок на одну пробу). Розчин готувати перед роботою.
8. Розчин казеїну по Гаммерстену 2%. Наважку 2 г казеїну перенести в хімічну колбу, прилити 98 мл трис-буферу, кип'ятити 15 хв на водяній бані.

8. Основний розчин трипсину. Наважку 5 мг трипсину розчинити в 5 мл 0,025 н соляної кислоти. Зберігати в холодильнику.
9. Робочий розчин трипсину готувати перед визначенням: основний розчин трипсину розвести до концентрації 62,5 мкг/мл (в 16 разів) буфером з кальцієм (для $n = 50,133$ мл основного розчину трипсину долити 2 мл трис-буферу з кальцієм).
10. Сліну свіжезібрану (до 2 годин зберігання) розвести розчином хлориду натрію 0,9% в 100 разів безпосередньо перед визначенням.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. В центрифужні пробірки внести відповідно по 0,2, 0,3, 0,4 мл слини, введеної в 100 разів, в контрольну - 0,2 мл 0,9% розчину хлориду натрію.
2. В кожну пробірку додати по 0,2 мл робочого розчину трипсину.
3. Втримати 15 хв при температурі 20°C.
4. Об'єм вмісту пробірок довести трис-буфером до 1 мл.
5. В контрольну пробу додати 3 мл 5% розчину ТХО.
6. В кожну пробірку долити 1 мл 2% розчину казеїну.
7. Інкубувати проби при температурі 37°C 20 хв.
8. В усі пробірки, за виключенням контрольної, додати 3 мл 5% розчину ТХО.
9. Центрифугувати 30 хв при 3000 об/хв.
10. За допомогою фільтрувального паперу профільтрувати центрифугат.
11. Визначити оптичну щільність профільтрованого центрифугату на СФ-16 проти контролю при довжині хвилі 280 нм

12,5 x E проби x 100 мкг зруйн. трипсину

Розрахунок: $\frac{\text{-----}}{0,2 \text{ мл слини}}$

Побудова калібрувального графіку.

1. В центрифужні пробірки внести по 0,2 мл 0,9% розчин хлориду натрію.
2. Потім внести в кожну пробірку робочий розчин трипсину та трис-буфер з кальцієм в такому співвідношенні:

1. 0,2 мл робочого розчину трипсину
2. 0,15 мл робочого розчину трипсину + 0,05 мл буферу з кальцієм
3. 0,1 мл робочого розчину трипсину + 0,1 мл буферу з кальцієм
4. 0,05 мл робочого розчину трипсину + 0,15 мл буферу з кальцієм

Кількість введеного трипсину в пробірках:

1. 12,5 мкг трипсину
2. 9,35 мкг трипсину
3. 6,25 мкг трипсину
4. 3,125 мкг трипсину

Аналіз проводити за ходом визначення починаючи з п.3.

По кількості введеного трипсину (вертикальна вісь), отриманій оптичній густині (горизонтальна вісь) побудувати калібрувальний графік, по якому визначати кількість зруйнованого трипсину.

Література: Веремсенко К.Н. Кінінова система.- Київ: Здоров'я, 1971 - 161-162.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ α -АМІЛАЗИ (набір «Біо – Lachema – Test», Чехія)

ПРИНЦИП МЕТОДУ

α -амілаза каталізує гідроліз нерозчинного кольорового крохмального субстрату з утворенням синього, розчинного у воді барвника. Кількість вивільненого барвника пропорційна активності ферменту.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Пробірки скляні центрифужні, ГОСТ 1770-74
2. Колба мірна місткістю 50 мл, ГОСТ 1770-74
3. Стакан хімічний місткістю 50 мл, ГОСТ 1770-74.
4. Дозатор піпетковий ПІ-0,1, ТУ 64-1-3329-81
5. Піпетка скляна мірна місткістю 1, 5, 10 мл, ГОСТ 20292-74.
6. Вата целюлозна, ТУ У 24.4.-31301408-002-2001
7. Магнітний змішувач
8. Цетрифуга ОПн-36ХЛ 4.2 ТО 5 375-4260-76.
9. Мікроколориметр медичний фотоелектричний МКМФ-1, ТУ 3-3. 1210
10. Термостат ТС – 80М-2, ТУ 64-1-1382-83.

РЕАКТИВИ

1. Концентрований буферний розчин (фосфатний буфер 0,67 моль/л, хлорид натрію 0,1 моль/л).
2. Нерозчинний крохмальний субстрат.
3. Осаджуючий розчин (сульфат магнію 1,85 моль/л з додаванням допоміжних реактивів).

РОЗЧИНИ

1. Розведений буферний -розчин: в мірну колбу місткістю 50 мл внести 10 мл концентрованого буферного розчину і додати до мітки дистильовану воду, перемішати.
2. Суспензія субстрату: в стакан місткістю 50 мл внести 10 мл розведеного буферного розчину і при постійному перемішуванні на магнітному змішувачі, повільно додати субстрат. Перемішувати приблизно 15 хв

решення гомогенної суспензії. Приготовану таким чином суспензію витримати 1 тиждень при температурі від +1 до +4°C, краще у дозованому посуді по 1 мл.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

У центрифужні пробірки "контроль" і "дослід" внести по 1 мл суспензії сироватки і витримати у термостаті при 37°C на протязі 5 хв.

При роботі з сироваткою крові у пробірку "контроль" і "дослід" внести по 0,5 мл відповідно дистильованої води і сироватки крові. При роботі з сироваткою "контроль" і "дослід" додати по 0,05 мл відповідно дистильованої води і сечі.

Всі пробірки перемішати, інкубувати 15 хв при 37°C.

У всі пробірки прилити по 2 мл осаджуючого розчину, перемішати і витримати стояти 15 хв.

Проби центрифугувати 5 хв при 3000 об/хв і фільтрувати через 1 шар безцелюлозної вати. (Не можна користуватися фільтрувальним папером).

Виміряти оптичну густину проби "дослід" проти проби "контроль" на довжині хвилі, яка знаходиться у інтервалі 590-620 нм у кюветі з оптичною ходом променя 10 мм і об'ємом приблизно 2 мл.

У випадку, якщо проба має екстремальну величину активності, її слід розвести фізіологічним розчином, а результат помножити на коефіцієнт.

Розрахунок

Активність проби знаходиться за таблицею, яка наведена в методичі набору, або по калібрувальній кривій побудованій за табличними даними. Величини, які приведені у таблиці відповідають оптичній густині, виміряній при 590 нм. Якщо оптична густина вимірювалася на довжині хвилі 600-620 нм, необхідно табличні дані активності елемента помножити на коефіцієнти: 600 нм – 1,005; 610 нм – 1,030; 620 нм – 1,035.

Результати отримані для сечі помножити на 2,0.

Нормальні величини: для сироватки крові 140-350 Е/л,

для сечі – 1000-2000 Е/л.

Примітка:

Посуд для визначення альфа-амілази не можна мити миючими засобами, не містять детергенти. Посуд миють хромовою сумішшю.

У випадку викристалізації буферного розчину кристали необхідно видалити нагріванням, помутніння не заважає визначенню, якщо зникає після розведення буферного розчину.

Таблиця для калібрування (для довжини хвилі 590 нм)

Оптична густина	Активність ферменту, Е/л	Оптична густина	Активність ферменту, Е/л	Оптична густина	Активність ферменту, Е/л
0,046	40	0,229	220	0,679	700
0,068	60	0,259	250	0,769	800
0,089	80	0,288	280	0,859	900
0,110	100	0,307	300	0,948	1000
0,120	110	0,354	350	1,037	1100
0,130	120	0,402	400	1,125	1200
0,150	140	0,449	450	1,212	1300
0,170	160	0,495	500	1,473	1600
0,190	180	0,541	550	1,645	1800
0,210	200	0,587	600	1,816	2000

- Література:* 1. В. Klein, J.A. Foreman, R.L. Searcy: Anal. Biochem. 31, 412 (1970).
2. J. Picher, J. Tovarek: Clin. Chem. 21, 168 (1975).

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ СЕЧОВИНИ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ТА СЕЧІ ЗА КОЛЬОРОВОЮ РЕАКЦІЄЮ І ДИАЦЕТИЛМОНООКСИМОМ (набір «Біо – Lacheta – Тест», Чехія)

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Сечовина з діацетилмонооксимом у присутності тіосемикарбамідних іонів трьохвалентного заліза у сильноокислому середовищі утворює червоний комплекс, який фотометрують.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74
2. Циліндр мірний місткістю 25 мл, ГОСТ 1770-74
3. Колби мірні місткістю 50, 250 мл, ГОСТ 1770-74
4. Піпетка скляна мірна місткістю 1, 5, 10 мл, ГОСТ 20292-74
5. Дозатор піпетковий ПІ-0,01, ТУ 64-1-3329-81
6. Баня водяна
7. Мікроколориметр медичний фотоелектричний МКМФ-1, ТУ 1.540.008
8. Штатив поліетиленовий для пробірок ПШШ 02-40, ТУ 64-1-2669-81

РЕАКТИВИ

Актив (містить отруйний тіосемикарбазид) – входить до складу набору стандартний розчин сечовини, концентрація 16,65 ммоль/л
Висота сірчана концентрована, кваліфікація “чда” ГОСТ 4207-77

РОЗЧИНИ

Розчин реактиву: таблетку реактиву розчини при помірному нагріванні в мірній колбі місткістю 50 мл у 30 мл дистильованої води. Після охолодження об'єм довести до мітки дистильованою водою, перемішати.
Розчин реактиву стійкий при кімнатній температурі на протязі декількох годин. Найявність невеликої кількості осаду не заважає визначенню.

Розчин сірчаної кислоти: у мірну колбу місткістю 250 мл внести 150 мл дистильованої води і при постійному помішуванні влити 100 мл концентрованої 96% сірчаної кислоти. Після охолодження об'єм розчину доповнити до мітки дистильованою водою, перемішати. Розчин стабільний необмежений час.

Робочий розчин: змішати розчин реактиву з розчином сірчаної кислоти в співвідношенні 1:1. Робочий розчин слід виготовляти перед визначенням.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

В центрифужні пробірки “контроль”, “дослід”, “стандарт” внести по 2,0 мл відповідно дистильованої води, сироватки крові (сечі розведеної 10 разів дистильованою водою), стандартного розчину сечовини.

У всі пробірки додати по 2,0 мл робочого розчину, зміст перемішати.

Проби накрити кришками із алюмінієвої фольги і помістити точно на 10 см у киплячу водяну баню;

Пробірки охолодити у холодній воді;

Не пізніше, ніж через 15 хв, виміряти оптичну густину проб “дослід” і “стандарт” проти проби “контроль” на мікрофотокolorиметрі МКМФ-1 (або мікрофотометрі) у кюветі 1 см, при довжині хвилі, яка лежить у інтервалі від 540 нм.

Розрахунок

Вміст сечовини у сироватці крові розрахувати за формулою:

$$C_{\text{досл}} = \frac{C_{\text{ст}}}{E_{\text{ст}}} E_{\text{досл}}, \text{ де}$$

$C_{\text{ст}}$ – концентрація сечовини у сироватці крові, ммоль/л;

$C_{\text{досл}}$ – концентрація сечовини у стандартній пробі, дорівнює 16,65 ммоль/л;

$E_{\text{ст}}$ – оптична густина проби “стандарт”;

$E_{\text{досл}}$ – оптична густина проби “дослід”.

Для сечі:

Для обрахування вмісту сечовини, розрахунки для сироватки помножити на коефіцієнт розведення сечі 50 або 100.

Добова кількість сечовини, що виводиться із сечею (ммоль/24 год)

$$M = C_{\text{досл}} \times V, \text{ де}$$

M - добова кількість сечовини, що виводиться із сечею (ммоль/24 год)

$C_{\text{досл}}$ - концентрація сечовини у середньодобовій дослідній пробі, ммоль/л

V - об'єм сечі, що виводиться за 24 год, л.

Нормальні величини: сироватка - 2,5 - 8,32 ммоль/л
сеча - 333 - 583 ммоль/24 год.

Примітка: При вмісті сечовини більше 23,3 ммоль/л, сироватку необхідно розвести дистильованою водою, а результат аналізу помножити на коефіцієнт розведення.

Література: 1. Crocker C.L.: Amer. J. Med. Technol. 33, 361 (1967). - 2. Rabinowitz R.: Clinical Chemistry. Academic Press. (1969).

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНИХ ЛІПІДІВ У СИРОВАТЦІ КРОВІ (набір «Bio - Lachema - Test», Чехія)

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Ненасичені ліпіди і жирні кислоти, фосфоліпіди і холестерин підлягають гідролізу сірчаною кислотою взаємодіють із фосфованіліновим реактивом з утворенням червоного забарвлення.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Пробірки хімічні, ГОСТ 25336-82
2. Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74
3. Піпетка скляна місткістю 2,0 мл, ГОСТ 20292-74
4. Дозатор піпетковий П1-0,02, ТУ 64-1-3329-81
5. Плитка електрична з зак. сп, тип ЕПШ-1-0,8, ГОСТ 14919-836
6. Баня водяна
7. Мікроколориметр медичний фотоелектричний МКМФ-1, ТУ 1.540.008
8. Штатив для пробірок поліетиленовий ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669-81

РЕАКТИВИ

Склад набору:

1. Кислота ортофосфорна, кваліфікація "чда" ГОСТ 6652-80
2. Кислота сірчана концентрована, кваліфікація "чда", ГОСТ 4204-71

Ванілін
Фосфоліпіди.

РОЗЧИНИ

Фосфованіліновий реактив: суміш розчинів ваніліну 10 ммоль/л та фосфорної кислоти 11,5 моль/л.
Контрольний розчин ліпідів концентрацією 8 г/л

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

У чотирі пробірки "дослід", "контроль", "стандарт" внести по 0,02 мл сироватки, дистильованої води і стандартного розчину ліпідів.

Провести гідроліз: у всі пробірки долити по 1,5 мл концентрованої фосфорної кислоти, перемішати вміст проб і витримати протягом 15 хв на водяній бані, потім охолодити у холодній воді.

У решти сухі пробірки "дослід", "контроль", "стандарт" внести по 0,1 мл стандартного гідролізату, додати по 1,5 мл фосфованілінового реактиву, пробірок перемішати і залишити стояти 40-50 хв при кімнатній температурі, потім знову перемішати.

Через 60 хв виміряти оптичну густину проб "дослід" та "стандарт" і проб "контроль" при довжині хвилі, яка знаходиться у інтервалі вимірювання 510-550 нм у кюветі з довжиною оптичного шляху 1 см (для ФМФ-1 – 515 або 540 нм).

Розрахунок

$$C_{\text{анал}} = \frac{C_{\text{станд}} \cdot E_{\text{досл}}}{E_{\text{станд}}} = E_{\text{досл}} \text{ г/л, де}$$

$C_{\text{анал}}$ – концентрація ліпідів сироватки крові, г/л;

$C_{\text{станд}}$ – концентрація ліпідів у стандартному розчині, дорівнює 8 г/л;

$E_{\text{досл}}$ – оптична густина проб "дослід" та "стандарт".

Нормальні величини: у сироватці крові здорових людей 4 – 8 г/л.

Примітка. Забір проби для визначення загальних ліпідів повинен бути здійснений мінімально через 14 годин після останнього прийому їжі. У протилежному випадку нормальні величини можуть бути занижені навіть до 10 г/л. Якщо отримана екстинкція проби перевищує норму, то визначення потрібно повторити з пробою, попередньо розведеною водою.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ КАЛЬЦІЮ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ТА СЕЧІ З ОРТО- КРЕЗОЛФТАЛЕЇНКОМПЛЕКСОНОМ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Орто-крезолфталейнкомплексон у лужному середовищі утворює з іонами кальцію фіолетовий комплекс, який придатний для фотометричного визначення.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Пробірки скляні центрифужні, ГОСТ 1770-74
2. Колби мірні місткістю 50 мл, ГОСТ 1770-74
3. Дозатор піпетковий П1-2, П1-20, ТУ 64-1-3329-81
4. Піпетка скляна мірна 2,0 мл, ГОСТ 20292-74;
5. Мікроколориметр медичний фотоелектричний МКМФ-1, ТУ 2Т 1.540

РЕАКТИВИ (З НАБОРУ)

1. Стабілізований орто-крезолфталейнкомплексон - 1 флакон
Склад: О-крезолфталейн- 4 мкмоль/флакон
8-оксихинолін- 0,155 ммоль/флакон
тіоацитамід- 10 мкмоль/флакон
1. Буфер (1 флакон) – N-метил-D-глюкаміновий буфер-15 ммоль/флакон
2. Розчин кальцію- 4 ммоль/л
3. Соляна кислота концентрована, кваліфікація чда, ГОСТ 3118-77
4. Комплексон – 3 (трилон Б). ГОСТ 10652-63

РОЗЧИНИ

1. Розчин 1: вміст флакону з реактивом 1 кількісно перенести у мірну колбу місткістю 50 мл, розчинити у бідистильованій воді. Перемішати, додати 20 мкл соляної кислоти, довести об'єм до мітки бідистильованою водою, знову перемішати. Стійкий 3 неділі при температурі від +2 до +8°C.
2. Розчин 2. Вміст флакону з реактивом 2 кількісно перенести у мірну колбу місткістю 50 мл, розчинити у бідистильованій воді, довести об'єм до мітки, перемішати. Стійкий 1 місяць при температурі від +2 до +8°C.
3. Розчин 3. Розчини 1 і 2 змішати у співвідношенні 1:1. Стійкий 2 дні при температурі від +2 до +8 °С при зберіганні у темному місці.
4. Реактив 4 (стандартний розчин кальцію, 2 ммоль/л): Реактив 3 розвести бідистильованою водою у співвідношенні 1:1. Стійкий 3 місяць при температурі від +2 до +8 °С.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74
2. Піпетки мірні скляні місткістю 1, 10 мл, ГОСТ 20292-74
3. Дозатор піпетковий ПІ-0,5, ТУ 64-1-3329-81
4. Центрифуга ОПн – ЗУХЛ 4.2, ТУ 5 375-4260-76.
5. Мікроколориметр медичний фотоелектричний МКМФ-1, ТУ 1.540.008
6. Холодильник побутовий, ТУ 84-89

РЕАКТИВИ

1. Кислота трихлороцтова (ТХО), кваліфікація “чда” ГОСТ 6-09-25.38
2. Кислота пікринова, кваліфікація “ч” ТУ 6-09-08-317-80
3. Натрію гідроксид, кваліфікація “чда” ГОСТ 4328-77
4. Креатинін ліофілізований, 442,5 мкмоль/л.
5. Альбумін ліофілізований, 20 г/л.

РОЗЧИНИ

1. Розчин трихлороцтової кислоти, 1,22 моль/л (199,3 г/л) $M = 163,13$
2. Розчин пікринової кислоти, 0,04 моль/л (9,16 г/л) $M = 229,0$
3. Розчин гідроксиду натрію, 0,75 моль/л (30 г/л) $M = 40$
4. Розчин креатиніну 442,5 мкмоль/л: з флакону “креатинін” зняти металічну кришку, у флакон через резинову пробку тонкою голкою ввести помірно обережно виїняти резинову пробку і ввести точно 8,0 мл дистильованої води. Флакон закрити резиновою пробкою і розчинити ліофілізат, декілька разів перевернувши флакон догори дном.
5. Розчин альбуміну 20 г/л: у флакон “альбумін” таким же способом ввести 8,0 мл дистильованої води, розчинити ліофілізат.
6. Стандартний розчин креатиніну концентрації 177 мкмоль/л: змішати 1 мл розчину креатиніну 442,5 мкмоль/л та 6,0 мл розчину альбуміну 20,0 г/л.

Розчини креатиніну, альбуміну і стандартний розчин креатиніну зберігати у морозильній камері.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

Для сироватки крові:

1. В центрифужну пробірку “дослід” внести 0,5 мл сироватки, в пробірку “контроль” і “стандарт” по 0,5 мл відповідно дистильованої води і стандартного розчину креатиніну.
2. У всі пробірки прилити по 1,0 мл дистильованої води.
3. Додати у всі пробірки по 0,5 мл розчину трихлороцтової кислоти, перемішати, залишити стояти 5 хв.
4. Центрифугувати при 3000 об/хв 10 хв.

У кожну пробірку внести:

- 1) 0,5 мл відповідного супернатанту
- 2) 0,5 мл розчину пікринової кислоти
- 3) 0,5 мл гідроксиду натрію, перемішати.

Вимірювати через 20 хв проби "дослід" і "стандарт" фотометрувати проти "антронону" на реактиви у кюветі 1 см при довжині хвилі 500-510 нм.

Для сечі:

Перед визначенням сечу розвести дистильованою водою у 100 раз (1 частини сечі і 99 об'ємів дистильованої води), а стандартний розчин креатиніну 177 ммоль/л розвести дистильованою водою у співвідношенні 1:1.

У пробірки "дослід", "контроль" і "стандарт" внести 0,5 мл відповідно розведеної сечі, дистильованої води і розведеного стандарту.

У всі пробірки прилити: 0,25 мл розчину ТХО

0,5 мл розчину пікринової кислоти

0,5 мл гідроксиду натрію, перемішати.

Через 20 хв вимірити оптичну густина в кюветі 1 см при довжині хвилі 500-510 нм.

Розрахунок

Концентрація креатиніну у сечі:

$$\frac{177}{\Gamma} = \frac{E_{\text{досл}}}{E_{\text{ст}}} \times 100 = 177 \frac{E_{\text{досл}}}{E_{\text{ст}}} \times 50 \text{ ммоль/л}$$

Відомі величини: для чоловіків – 61-115 ммоль/л

для жінок – 53-97 ммоль/л

Примітка: якщо вміст креатиніну у пробі перевищує 442 ммоль/л, визначення необхідно повторити з пробою розведеною водою. При замірі оптичної густини температура повинна становити $20 \pm 1^\circ\text{C}$.

Література: Glick D. Methods of Biochemical Analysis, Vol. 7, p. 193, Interscience, New York, 1959.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ГЛІКОГЕНУ

В ТКАНИНІ ПЕЧІНКИ ТВАРИН (по Зейфтер)

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Глікоген виділяється з тканини гарячим гідроксидом калію. Метод оснований на фотометричному визначенні інтенсивності кольорової реакції глікогену з сірчаноокислим розчином антронну при гідролізі глікогену сірчаною кислотою до утворення глюкози.

ОБЛАДНАННЯ ТА МАТЕРІАЛИ

1. Колориметр фотоелектричний концентраційний, КФК-2-УХЛ 4 2 1 3-3.1766-82
2. Терези електронні ВЛ Е-134, ГОСТ 24104-88
3. Терези лабораторні ВЛР-200, 2 кл., ГОСТ 19491-74
4. Баня водяна
5. Дозатор піпетковий П1-200, ТУ 64-1-3329-81
6. Піпетки мірні скляні, місткістю 1, 2, 5 мл, ГОСТ 20292-74
7. Колби мірна місткістю 100, 250 мл, ГОСТ 1770-74
8. Циліндр мірний місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74;
9. Стакан хімічний місткістю 50 мл, ГОСТ 1770-74;
10. Пробірки центрифужні мірні, ГОСТ 1770-74;
11. Штатив для пробірок поліетиленовий ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669-81

РЕАКТИВИ:

1. Калію гідроксид, кваліфікація "чда", ГОСТ 24363-80
2. Кислота сірчана концентрована, кваліфікація "чда", ГОСТ 4204-77
3. Антрон, кваліфікація "ч", ТУ 6-09-08-1833-86
4. Глюкоза, кваліфікація "чда", ГОСТ 6038-51

РОЗЧИНИ

1. Стандартний розчин глюкози, 200 мкг/мл (0,2 мг/мл): наважку глюкози, масою 20 мг, зважену з точністю 0,0001 г кількісно перенести у мірну колбу місткістю 100 мл, розчинити у дистильованій воді довести об'єм розчину до мітки, перемішати. Зберігати у холодильнику протягом 1 тижня.
2. 30% розчин гідроксиду калію: наважку гідроксиду калію масою 30 г зважену з точністю 0,1 г, розчинити в 70 мл дистильованої води перемішати. Розчин зберігати в поліетиленовому посуді.
3. 0,2 г-% розчин антрону в концентрованій сірчаній кислоті: наважку антрону масою 0,04 г, зважену з точністю 0,005 г, розчинити в 20 мл сірчаної кислоти. Готувати безпосередньо перед використанням.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. Наважку тканини печінки, масою 50 мг помістити у центрифужну пробірку, долити 3 мл 30% розчину калію гідроксиду, прикрити склянкою кришкою і витримати на киплячій водяній бані 20-30 хв до повного розчинення тканини. (Приготування 18% гідроксиду калію: у окрему пробірку помістити 3 мл 30% гідроксиду калію та 2 мл дистильованої води)
2. Розчин з тканиною охолодити, довести дистильованою водою до об'єму 5 мл і перемішати.

в пробірці “дослід”, “контроль”, “стандарт” внести по 0,2 мл розчину тканини, 18% розчину гідроксиду калію, стандартного розчину глюкози. У проби “дослід” та “контроль” прилити по 0,8 мл дистильованої води; у пробу “стандарт” – 0,2 мл 18% розчину гідроксиду калію та 0,6 мл дистильованої води.

Випарувати розчин антрону у концентрованій сірчаній кислоті. У пробірці додати по 2 мл розчину антрону, перемішати і витримати в водяній бані протягом 10 хв. Потім швидко охолодити у дистильованій воді, дати постояти у темному місці 30 хв.

Визначити оптичну густину дослідної проби ($E_{\text{досл}}$) та стандартної проби ($E_{\text{станд}}$) проти проби “контроль” на КФК-2 при довжині хвилі 540 нм у кюветі з довжиною оптичного шляху 5мм.

Розрахунок

Кількість глікогену у перерахунку на 1 кг тканини розрахувати за формулою:

$$\frac{C_{\text{станд}}}{E_{\text{станд}}} \cdot E_{\text{досл}} \cdot V \cdot \frac{M_1}{M_2} \cdot 1,1 \text{ мг/кг, де}$$

- $C_{\text{станд}}$ – концентрація глюкози в стандартному розчині, мг/мл; дорівнює 0,2;
- $E_{\text{станд}}$ – відповідно екстинкції проб “стандарт” і “дослід”;
- V – об’єм розчину з розчиненою тканиною, мл; дорівнює 5;
- M_1 – кількість мг у кг тканини, дорівнює 10^6 ;
- M_2 – наважка тканини, яку взяту для досліді, мг; дорівнює 50;

перерахунок глюкози на глікоген.

$$\frac{0,2}{E_{\text{станд}}} \cdot E_{\text{досл}} \cdot 5 \cdot \frac{10^6}{50} \cdot 1,1 \text{ мг/кг} = 2 \cdot 10^4 \cdot 1,1 = 2,2 \cdot 10^4 \cdot \frac{E_{\text{досл}} \text{ мг глікоген}}{E_{\text{станд}} \text{ кг тканини}}$$

Література: 1. Практикум по біохімії / Под ред. Северина С.Е., Савельевой Г.А. – М.: МГУ, 1989. – С. 23-24. 2. Асатиани В.С. Методы биохимических исследований. – М.: Медгиз, 1956. – С. 255-257.

**СТАНДАРТНА МЕТОДИКА
КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ РНК ТА ДНК В
СУБКЛІТИННИХ ФРАКЦІЯХ КЛІТИН ТВАРИН**

ПРИНЦИП МЕТОДУ

В основі методу лежить послідовне видалення кислоторозчинних фракцій ліпідів, виявлення і визначення при допомозі лужного та потного гідролізу нуклеїнових кислот.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Пробірки центрифужні місткістю 10 мл, ГОСТ 1770-74
2. Піпетки скляні градуйовані місткістю 2, 10 мл, 2-й клас, ГОСТ 20292-74
3. Дозатор піпетковий ПІ-0,1, ТУ 64-1-3329-81
4. Колби мірні місткістю 500, 1000 мл, ГОСТ 177-74
5. Ножиці очні гострокінцеві, ТУ 64-1-64-78
6. Пінцет анатомічний, ТУ 64-1-1238-78
7. Штатив пластмасовий ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669-83
8. Лоток для льоду
9. Терези електронні ВЛ Е- 134, ГОСТ 104-88
10. Термостат ТС-80 М-2 ТУ 64-1-1382-83
11. Центрифуга ОПН-8-УХЛ 42 ТУ 5. 375-4260-76
12. Холодильник побутовий, ТУ 84-89
13. Спектрофотометр СФ-46 (Ломо, Росія), ТУ 3-3.1841-84

РЕАКТИВИ

1. Кислота хлорна концентрована, кваліфікація "хч", ТУ 6-09-2878-74
2. Гідрооксид калію (гранульований), кваліфікація "ч", ("Lachema Chemapol, Чехія).

РОЗЧИНИ

1. 0,3 М розчин хлорної кислоти: 14 мл хлорної кислоти концентрацією 66,24% перенести в мірну колбу місткістю 500 мл, долити дистильованою водою до мітки, перемішати.
2. 0,5 М розчин хлорної кислоти: 46,7 мл хлорної кислоти концентрацією 66,24% перенести у мірну колбу місткістю 1000 мл, долити дистильованою водою до мітки, перемішати.
3. 0,6 М розчин хлорної кислоти: 28 мл хлорної кислоти концентрацією 66,24% перенести у мірну колбу місткістю 500 мл, долити дистильованою водою до мітки, перемішати.
4. 0,6 М розчин гідрооксиду калію: наважку 23,4 г гідрооксиду калію, зважену з точністю 0,005 г, перенести у колбу місткістю 1000 мл, розчинити у невеликій кількості дистильованої води, довести об'єм до мітки та перемішати.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

Визначення проводити на холоді в центрифужних пробірках паралельними пробами.

1. Наважку тканини 0,1 г гомогенізувати з 0,4 мл дистильованої води кожну з 4 пробірок внести 0,1 мл гомогенату та 1,9 мл 0,3 М розчину хлорної кислоти. Для повного осадження кислотонерозчинної фракції пробірки на 15 хвилин помістити на льодяну баню.

Центрифугувати 15 хв при 3000 об/хв. Надосадову рідину злити. Осади рази промити 0,2 М розчином хлорної кислоти. Щоб запобігти зрідненню осадової фракції кислоторозчинним матеріалом, який вміщується в надосадовій рідині, стінки пробірки старанно підсушити фільтрувальним папером.

Осади розтерти скляною паличкою та суспендувати в 0,5 мл дистильованої води, додати 0,5 мл 0,6 М розчину гідроксиду калію. Суспензія світлішає.

Провести інкубацію при 37° С протягом 1 години. Для зупинки гідролізу після інкубації пробірки перенести в льодяну баню.

В кожну пробірку додати по 2 мл 0,6 М розчину хлорної кислоти, виміряти на 15 хв на льоду.

Центрифугувати 10 хв при 3000 об/хв. Надосадову рідину паралельних пробірок об'єднати і для визначення вмісту РНК виміряти поглинання в ультрафіолетовому світлі при довжині хвилі 260 нм.

Стінки пробірок старанно підсушити, в одержаному осаді в подальшому визначити вміст ДНК.

Для перерахунку величини оптичної густини при 260 нм в мг РНК використати значення $E_{1\%}^{1\text{см}, 260} = 312$.

У підсушені пробірки з осадом додати по 4 мл 0,5 М розчину хлорної кислоти. Гідроліз проводити на киплячій водяній бані, протягом 20 хв змивши пробірки каплевловлювачами.

Злити вміст двох пробірок в одну, виміряти поглинання при довжині хвилі 270 нм та 290 нм проти контрольного розчину – 0,5 М розчину хлорної кислоти.

Кількість ДНК в мкг на 1 мл надосадової рідини визначати за формулою:

$$\frac{D_{270} - D_{290}}{0,19} * 10,1$$

Література: Трудолюбова М.Т. Количественное определение РНК и ДНК в клеточных фракциях клеток животных / Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 1977.- С.313.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ СЕРЕДНІХ МОЛЕКУЛ В СИРОВАТЦІ КРОВІ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Метод оснований на вимірюванні поглинання при довжині хвилі 254 нм оптичної густини сироватки крові звільненої від грубодисперсних білків.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Пробірки центрифужні місткістю 10 мл, ГОСТ 1770-74
2. Піпетки скляні градузовані місткістю 1 мл, 5 мл, 2-й клас, ГСТ 20292-74
3. Дозатор піпетковий П1- 0,5, ТУ 64-1-332981
4. Колби мірні місткістю 1000 мл, ГОСТ 177-74
5. Штатив пластмасовий ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669-83
6. Терези електронні, ВЛ Е-134, ГОСТ 104-88
7. Центрифуга ОПН-8-УХЛ 42, ТУ 5. 375-4260-76
8. Спектрофотометр СФ-46, (Ломо, Росія) ТУ 3-3. 1841-84

РЕАКТИВИ

1. Трихлороцтова кислота, кваліфікація "ч", ТУ 6.09-1926-77

РОЗЧИНИ

1. Трихлороцтова кислота (ТХО) 10% розчин: в мірну колбу місткістю 1000 мл перенести 100 г кислоти, зваженої з точністю до 0,01 г, додати 900 мл дистильованої води, відміреної з точністю до 1 мл. Добре перемішати. Розчин зберігати в склянці з притертою пробкою при кімнатній температурі.

Розчин стійкий.

Примітка: при роботі з розчином необхідно бути обережним і дотримуватись правил роботи з отрутою та їдкими речовинами.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. В штатив помістити пронумеровані центрифужні пробірки. Кількість пробірок в ряду відповідає кількості проб, що підлягають аналізу.
2. Сироватку крові обробити 10% розчином ТХО в співвідношенні 1:10.
3. Центрифугувати 30 хв при 3000 об/хв.
4. Відібрати по 0,5 мл надосадової рідини у центрифужні пробірки, додати 4,5 мл дистильованої води.
5. Контроль для визначення середніх молекул: до 0,5 мл ТХО додати 4,5 мл дистильованої води.
6. Виміряти поглинання при $\lambda=254$. Рівень середніх молекул виражається в одиницях, кількість яких дорівнює показникам екстинкції.

Нормальні показники в сироватці крові здорових людей середніх молекул прийнято $0,240 \pm 0,02$ од.

Література: Методи досліджень в профпатології / Под ред. Архипова О.Г. - М.: Медицина, 1988.-С.85.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ МІНІШКОВОГО АЗОТУ КРОВІ (СЕЧІ) ПІСЛЯ МІНЕРАЛІЗАЦІЇ ПРЯМОЮ РЕАКЦІЄЮ З РЕАКТИВОМ НЕССЛЕРА

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Пробіркову рідину сироватки крові (або розведену сечу) спалюють з кислотою. При цьому всі азотні речовини переходять в нітратний амоній, який з реактивом Несслера дає жовте забарвлення, інтенсивність якого пропорційна вмісту азоту.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

- Чаша лабораторні електричні ВЛ Е -134, ГОСТ 24104-88
- Ваги лабораторні ВЛР-200, ГОСТ 19491-74
- Ексцимерметр фотоелектричний концентраційний КФК-2-УХЛ 4.2, ТУ 3-760-82
- Центрифуга лабораторна ОПН-3 УХЛ-4.2, ТУ 5375-4260-76
- Ваги пісочна
- Плита електрична з зак. сп, тип ЕПШ-1-0.8, ГОСТ 14919-836
- Шпатель для пробірок поліетиленовий ШПП-02-40 ТУ 64-1-2669-83
- Пробірки центрифужні 10 мл, ГОСТ 1770-74
- Пробірки хімічні, ГОСТ 25336-82
- Кубка мірна місткістю 100, 1000 мл, ГОСТ 1770-74
- Дозатор піпетковий ПІ-0.05, ПІ-0,1, ПІ-0,2, ПІ-0,5, ТУ 64-1-3329-81
- Піпетка скляна мірна місткістю 1, 2, 10 мл, ГОСТ 20292-74
- Папір універсальний індикаторний, ТУ 6-09-1181-76

РЕАКТИВИ

- Натрій сірчаноокислий, кваліфікація "чда", ГОСТ 4166-76
- Фосфорномолібденова кислота, кваліфікація "чда", ТУ МХП № ОРУ-1-33
- Кислота сірчана концентрована, кваліфікація "чда", ГОСТ 4207-77
- Натрію гідроксид, кваліфікація "чда", ГОСТ 4328-77
- Водню пероксид, кваліфікація "чда", ГОСТ 10929-76
- Амоній сірчаноокислий перекристалізований, кваліфікація "хч" ГОСТ 169-60
- Реактив Несслера, кваліфікація "чда", ТУ 6-09-2089-77

РОЗЧИНИ

- Реактив для осадження білку: наважки 0,5 г сірчаноокислого натрію і 0,5 фосфорномолібденової кислоти, зважені з точністю 0,005 г, кількісно

перенести в мірну колбу місткістю 100 мл, додати 0,5 мл концентрованої сірчаної кислоти, розчинити в дистильованій воді, об'єм розчину довести до мітки, перемішати.

2. Розчин натрію гідроксиду 250 г/л: наважку гідроксиду натрію масою 25 г, зважені з точністю 0,005 г, кількісно перенести в мірну колбу місткістю 100 мл, об'єм розчину довести до мітки дистильованою водою, перемішати. Зберігати в поліетиленовому посуді.

3. Стандартний розчин азоту концентрацією 0,05 мг/мл: наважку 0,1191 г перекристалізованого сірчаноокислого амонію (або 0,191 г перекристалізованого хлористого амонію), зважену з точністю 0,0001 г, кількісно перенести в мірну колбу місткістю 1000 мл, розчинити в дистильованій воді, об'єм розчину довести до мітки, перемішати.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

Осадження білку (для сироватки крові).

1. В центрифужну пробірку внести 2,8 мл розчину для осадження білку та 0,2 мл крові (сироватки), перемішати і через 10-15 хв центрифугувати протязі 10 хв при 3000 об/хв. (Осад має зелений колір, надосад – прозорий).

Для аналізу сечі останню розвести дистильованою водою у шість разів. Замість розчину для осадження білку використати дистильовану воду.

Мінералізація.

2. В хімічні термостійкі пробірки висотою не більше 10 см внести 0,5 мл центрифугату.

3. Додати 0,05 мл концентрованої сірчаної кислоти, перемішати.

4. Пробірки встановити на нагріту пісочну баню таким чином, щоб дні пробірки торкалось верхнього шару піску; не можна заривати їх в пісок, тому що при цьому відбувається перегрів і органічний азот розкладається не до сірчаноокислого амонію, а до вільного азоту, який випаровується. При нагріванні на пісочній бані спочатку випаровується вода, потім з'являється білий дим, що свідчить про закінчення мінералізації. Тривалість мінералізації 20-30 хв. Після мінералізації рідина в пробірці буріє (або жовтіє при малій кількості азоту).

5. Пробірки зняти з бані, охолодити при кімнатній температурі і додати до кожної пробірки по 0,05 мл водню пероксиду, знов поставити на пісочну баню до знебарвлення проби. Якщо після охолодження при кімнатній температурі рідина не повністю знебарвилася, повторно додати водню пероксид і нагріти на пісочній бані.

6. В знебарвлену рідину додати по 10 мл свіжепрокип'яченої дистильованої води та нейтралізувати розчином гідроксиду натрію концентрацією 250 г/л до слабо лужної реакції (приблизно 0,2-0,25 мл) по зміні кольору лакмусового паперу від червоного до синього.

Кольорова реакція (неселеризація).

4 В усі пробірки прилити по 0,5 мл реактиву Несслера. В результаті реакції вміст пробірок забарвлюється в жовтий колір різної інтенсивності в залежності від вмісту азоту. Контроль на реактиви повинні мати слабозабарвлення. Забарвлення стійке на протязі 15-20 хв.

Визначення вмісту азоту виконувати колориметрично (можна спектрометрично).

5 Приготувати проби "контроль" і "стандарт".

Склад проби "контроль": 10,0 мл дистильованої води, 0,05 мл концентрованої сірчаної кислоти, 0,3 мл розчину натрію гідроксиду 250 г/л,

0,5 мл реактиву Несслера.

Склад проби "стандарт": 9,8 мл дистильованої води, 0,2 мл стандартного розчину азоту (0,05 г/л), 0,05 мл концентрованої сірчаної кислоти, 0,3 мл розчину натрію гідроксиду 250 г/л, 0,5 мл реактиву Несслера.

6 Виміряти оптичну щільність проб "дослід" та "стандарт" проти проби "контроль" при довжині хвилі 440 нм у кюветі 5 мм.

Розрахунок

1. Вміст азоту в пробі "стандарт":

$$m_{ст} = C_{ст} \cdot V_{ст}, \text{ де}$$

$m_{ст}$ - вміст азоту в пробі "стандарт" мг;

$C_{ст}$ - концентрація азоту в стандартному розчині, мг/мл, дорівнює 0,05;

$V_{ст}$ - об'єм стандартного розчину в пробі "стандарт", мл, дорівнює 0,2.

$$m_{ст} = 0,05 \cdot 0,2 = 0,01 \text{ мг азоту}$$

2. Вміст азоту в пробі "дослід", що колориметрується:

$$m_{досл} = \frac{m_{ст}}{E_{ст}} \cdot E_{досл} = 0,01 \frac{E_{досл}}{E_{ст}}, \text{ де} \quad (1),$$

$m_{досл}$ - вміст азоту в пробі "дослід", мг;

$E_{досл}$, $E_{ст}$ - оптична щільність проб "дослід" і "стандарт" відповідно.

3. Вміст сироватки в пробі "дослід", що колориметрується:

$$V_{сир. колор} = \frac{V_{сир}}{V} \cdot V_1, \text{ де} \quad (2)$$

$V_{сир. колор}$ - вміст сироватки в пробі "дослід", що колориметрується, мл;

$V_{сир}$ - об'єм сироватки, в який вносять у осаджуючий розчин, мл; дорівнює 0,2

V - загальний об'єм сироватки та осаджуючого розчину (0,2 + 2,8), дорівнює 3 мл;

V_1 - об'єм розчину V , в який вносять пробу, що колориметрується, мл, дорівнює 0,5.

$$V_{досл} = \frac{0,2 \text{ мл}}{3} \cdot 0,5 = \frac{1}{30} \text{ мл}, \quad (3)$$

Для перерахунку кількості азоту на 1 мл сироватки слід вміст в пробі, що колориметрується, помножити на 30:

$$C_{N_2} = 0,01 \frac{E_{\text{доc}}}{E_{\text{сr}}} \cdot 30 = 0,3 \frac{E_{\text{доc}}}{E_{\text{сr}}} \text{ мг/мл, де} \quad (4)$$

C_{N_2} – концентрація азоту в сироватці крові, мг/мл;

Для сечі результат, отриманий для крові (4), слід помножити на 6 (кратність розведення сечі):

$$N, \text{ сечі} = 0,3 \times 6 \frac{E_{\text{доc}}}{E_{\text{сr}}} \text{ мг/мл} = 1,80 \frac{E_{\text{доc}}}{E_{\text{сr}}} \text{ мг/мл} \quad (5)$$

Нормальні величини у крові: 0,2-0,4 мг/мл.

Примітки: прямолінійна залежність між концентрацією аміаку в матеріалі, що досліджується, оптичною щільністю зберігається до 40 мг/мл. При більш високому вмісті азоту сироватку слід розвести дистильованою водою, а результат помножити на розведення.

Література: 1. Методические указания по применению унифицированных клинических лабораторных методов исследований / Под ред. Меньшикова И.В. М.: Медицина, 1973. - С. 47-50. - 2. Предтеченский В.Е., Боровская В.М., Маринин Л.Т. Лабораторные методы исследования. - М.: Медгиз, 1950. - С. 186-348

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ДЕЯКИХ ЖИРОРОЗЧИННИХ ВІТАМІНІВ У ПЛАЗМІ (СИРОВАТЦІ) КРОВІ ТА ТКАНИНАХ

ПРИНЦИП

Заснований на гідролізі дослідного матеріалу з послідовною екстракцією вітамінів гексаном та спектрофотометричним визначенням концентрації вітамінів при довжині хвилі, яка забезпечує максимальне поглинання світла для визначеного вітаміну:

α-токоферол (ТФ) - λ= 292 нм

оксн-α -токоферол - λ= 242 нм

вітамін А - λ=328 нм

β-карогін - λ=451 нм

α-токоферилхінон (ТФХ) - λ=272 нм

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Пробірки хімічні, ГОСТ 25336-82
2. Пробірки скляні центрифужні, ГОСТ 1770-74

4. Банка мірна місткістю 100, 500, 1000 мл, ГОСТ 1770-74
5. Шетка скляна мірна місткістю 1, 5, 10 мл, ГОСТ 20292-74
6. Ступка фарфорова
7. Терези електронні ВЛ Е-134, ГОСТ 24104-88
8. Спектрофотометр СФ-46 "Ломо", Росія, ТУ 3-3. 1841-84
9. Ванна баня
10. Дозатор піпетковий ПІ-0,5, ТУ 64-1-3329-81
11. рН-метр-мілівольтметр, тип рН-150, ГОСТ 22261-82
12. Шпатель для пробірок полістироловий ШПП-02-40, ТУ 64-1-2669-83
13. Універсальний індикаторний папір, (Lachema, Чехія)

РЕАКТИВИ

1. Калій фосфорнокислий однозаміщений, кваліфікація "чда" ГОСТ 4198-65
2. Натрій фосфорнокислий двозаміщений безводний, кваліфікація "чда", ТУ 64-64-72
3. Спирт етиловий 96°, ГОСТ 5962-67
4. Калію гідроксид, кваліфікація "ч", ("Lachema")
5. Кислота аскорбінова, (Київський вітамінний завод)
6. Гексан, кваліфікація "хч", ТУ 6-09-375-78
7. Натрію сульфат, кваліфікація "чда" ГОСТ 4171-66

РОЗЧИНИ

1. Буфер фосфатний, рН 7,4: наважки 1,18 г калію фосфорнокислого однозаміщеного та 4,30 г натрію фосфорнокислого двозаміщеного безводного кількісно перенести у мірну колбу місткістю 1000 мл, розчинити у дистильованій воді, довести об'єм до мітки, перемішати. Зберігати при температурі +4°C протягом 1 місяця.
2. Гідролізуюча суміш: для однієї проби - 10 мл спирту етилового 96°, 1 г гідроксиду калію, 0,1 г аскорбінової кислоти. Приготувати безпосередньо у пробірках перед використанням.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. У хімічних пробірках "дослід" та "контроль на реактиви" приготувати гідролізуючу суміш, перемішати.
2. У пробірки "дослід" внести 0,5 мл плазми (сироватки) крові або 10% гомогенату тканини. Для виготовлення гомогенату наважку тканини 100 мг розтерти у фарфоровій ступці з 0,9 мл фосфатного буферу. У пробірку "контроль" – 0,5 мл дистильованої води або (у випадку дослідження тканини) 0,5 мл фосфатного буферу.
3. Для гідролізу дослідного матеріалу пробірки помістити на водяну баню та витримати протягом 10 хв при температурі 80°C.

4. Пробірки охолодити у проточній воді, після чого сильним струменем піпетки внести 5 мл гексану. Додати дистильовану воду; при цьому рівня рідини у пробірці повинен бути нижче краю пробірки на 3 см.
5. Повільно та обережно перемішати рідину у пробірках, перевертаючи пробірку (контакт з резиною та пластиком недопустимий). Пробірки залишити до розшарування рідини.
6. Нижній шар рідини у пробірці видалити піпеткою.
7. Гексановий шар, який залишився, промити водою до повного видалення лугу. (Проба лакмусовим папером).
8. Визначити екстинкцію гексанового шару на спектрофотометрі при відповідній для даного вітаміну довжини хвилі.

Розрахунок

$$C = \frac{E_{\lambda}}{\epsilon_{\lambda}} \times \frac{V_{\text{гекс}}}{V_{\text{досл}}},$$

де C – концентрація вітамінів, які визначались при довжині хвилі λ мкм/мл;

E_{λ} – екстинкція проби “дослід” при довжині хвилі λ ;

ϵ_{λ} – коефіцієнт молярної екстинкції для довжини хвилі λ (екстинкція розчину який містить 1 моль/л речовини і знаходиться у кюветі 1 см), л. моль⁻¹·см

Коефіцієнти молярної екстинкції ϵ для:

- α -токоферолу (ТФ) – 3170
- окси- α -токоферол (ОТФ) – 8600
- вітамін А – 1550
- β -каротин – 2580
- α -токоферилхінон (ТФХ) –

$V_{\text{гекс}}$ – кінцевий об’єм гексанового шару, дорівнює 5 мл,

$V_{\text{досл}}$ – об’єм рідини, яка досліджувалась, дорівнює 0,5 мл.

Після перетворення:

$$C = \frac{E_{\lambda}}{\epsilon_{\lambda}} \times 10^4 \text{ мкмоль/мл.}$$

При дослідженні 10% гомогенату у перерахунку на 1 г тканини:

$$C = \frac{E_{\lambda}}{\epsilon_{\lambda}} \times 10^5 \text{ мкмоль/г.}$$

Література: Параніч А.В., Юхник О.С. Захисний ефект вітаміну Е при тотальній ішемії ізольованих органів щурів // Український фізіологічний журнал – 1993. – № 1, Т. 39. – С. 97-101.

6. Фіксацнал соляной кислоты 0,1 М, ТУ 6-09-2540-87
7. 2,2-дитіо-5-нітробензойна кислота (ДТНБК), ("Sigma", США)
Спирт етиловий 96^о, ГОСТ 5962-67

РОЗЧИНИ

1. Буферний розчин, рН 8,05: в мірну колбу місткістю 1000 мл перенести 6,06-трис (окси-метиламінометану гідрохлориду), зваженого на електронних вагах з точністю до 0,005 г, додати 500 мл дистильованої води, перемішати до повного розчинення. Додати 14,85 г ЕДТА, зваженого на електронних вагах з точністю до 0,005 г, перемішати до повного розчинення. Прилити 275 мл 0,1 Н розчину соляної кислоти, ретельно перемішати. Додати дистильовану воду майже до мітки та повторно перемішати. Залишити розчин при кімнатній температурі на 1 годину. Перевірити рН розчину і в разі необхідності довести рН до значення 8,05. Зберігати у холодильнику при (+8-+10)^о С протягом місяця.
2. Розчин трихлороцтової кислоти (ТХО), 30%: в хімічну колбу місткістю 1000 мл перенести 300 г ТХО, зваженої на технічних терезах з точністю до 0,01 г, 700 мл дистильованої води, відміреної з точністю до 1 мл, та добре перемішати. Розчин стійкий; зберігати в темній склянці з притертою пробкою при кімнатній температурі.
3. Розчин соляної кислоти концентрація 0,1 Н. (готувати із стандарт-титрів в мірну колбу місткістю 1000 мл перенести (дуже обережно, не допускаючи розбризкування розчину!) соляну кислоту із ампули стандарт-титрів. Ампулу добре промити дистильованою водою, збираючи промивні води в мірну колбу. Розчин у колбі перемішати, додати розчин дистильованою водою до мітки на колбі та ще раз добре перемішати. Розчин стійкий; зберігати у склянці з притертою пробкою при кімнатній температурі.
4. Розчин гідроксиду натрію, 20%: в хімічну термостійку колбу місткістю 100 мл перенести 20 г гідроксиду натрію, зваженого на електронних вагах з точністю до 0,001 г, додати 80 мл дистильованої води, перемішати до повного розчинення. Розчин стійкий, зберігати у пластиковій посудині при кімнатній температурі.
5. Реактив Елмана: в хімічну колбу місткістю 50 мл перенести 99 мг ДТНБК, зваженого на електронних вагах з точністю до 0,001 г, додати 25 мл спирту 96^о, перемішати до повного розчинення. Готувати перед використанням.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. В штатив помістити центрифужні пробірки, кількість пробірок відповідає кількості проб, що підлягають аналізу.
2. В пробірки внести 0,5 мл крові, додати 2 мл 30% трихлороцтової кислоти (при використанні методики для тканин, наважку 0,1 г тканини гомогенізувати з 2,4 мл 30% трихлороцтової кислоти). Добре перемішати сіяного палички. Через 10 хв центрифугувати впродовж 15 хв при 3000 об/хв.

3. Проби висті сухі, пронумеровані центрифужні пробірки відібрати 0,2 мл індофенолової рідини (для визначення відновленої форми глутатіону).
 4. По об'єму, який залишився додати цинкового порошку на кінчику індофенола (для переходу окислювальної форми у відновлювальну). Перемішати скляною паличкою.
 5. Через 10 хв профільтрувати в чисті пробірки та відібрати 0,2 мл фільтрату (для визначення загальної форми глутатіону).
 6. До 0,2 мл відібраних проб відновленої та загальної форми глутатіону додати 0,05 мл 20% розчину гідроксиду натрію та 5,0 мл трис-буферного розчину (рН 8,05), ретельно перемішати скляною паличкою.
 7. Перевірити рН проби, якщо потрібно, підвести рН до 8,08 слабким розчином соляної кислоти або гідроксидом натрію (якщо рН < 8,0 реакція відбувається, якщо рН > 8,1 проходить лужний гідроліз ДТНБК до амінофенільного аніона, що завищує результати).
 8. В пробірки додати 0,1 мл реактиву Елмана. Перемішати, витримати 20 хв при температурі 37° С.
 9. Виміряти оптичну густину розчинів на КФК-3 в кюветі з довжиною оптичного шляху 10 мм при довжині хвилі 412 нм проти контролю на реактиви.
 10. Розрахунок проводити по стандартному графіку. Для побудови графіку підготувати розчин глутатіону відновленого концентрацією 10 ммоль/л.
 11. Пронумеровані пробірки внести розчин глутатіону - 0 мл (0 ммоль/л), 0,05 мл (5 ммоль/л), 0,1 мл (10 ммоль/л), 0,2 мл (20 ммоль/л), додати 5,2 мл трис-буферного розчину (рН 8,05) та 0,1 мл реактиву Елмана. При цьому слід врахувати хід визначення глутатіону та внесення розчинів при визначенні рН проби. Якщо показники екстинкції великі, то проби слід розбавити трис-буферним розчином та виміряти екстинкцію.
- Література:* Elman G.L. Tissue sulphhydryl groups // Arch. Biochem.-1959.-№ 1.-с. 70-77

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ІНДОКСИДАЗНОЇ АКТИВНОСТІ ЦИТОХРОМУ P₄₅₀

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Під впливом цитохрому P₄₅₀ анілін гідроксильюється до амінофенолу. Амінофенол зв'язується з фенолом в присутності карбонату натрію, утворює фарбований в синій колір індофенольний комплекс.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74
2. Циліндри мірні місткістю 50, 100 мл, ГОСТ 1770-74
3. Шпатель для пробірок поліетиленові ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669-83

4. Піпетка скляна градуйована місткістю 2, 5 мл, 2-й клас, ГОСТ 20170-74
5. Колби мірні місткістю 50, 250, 500, 1000 мл, ГОСТ 1770-74
6. Секундомір тип СОС пр.-26-2-000, ТУ 23-1894. 003-90
7. Холодильник побутовий, ТУ 84-89
8. Термостат ТС-80, ТУ 64-1-1317-80
9. Терези електронні ВЛ Е-134, 2-й клас, ГОСТ 104-88
10. Дозатори піпеткові ПІ-2, ПІ-200, ПІ-100, ПІ-1000, ТУ 64-1-3117-80
11. Спектрофотометр СФ-46, (Ломо, Росія), ТУ 3-3. 1841-84
12. рН метр мілівольтметр, тип рН-150, ГОСТ 22261-82

РЕАКТИВИ

1. Хлорид калію, кваліфікація «ч», ГОСТ 4234-65
2. Сахароза, кваліфікація «чда», ГОСТ 5833-75
3. Трис (оксиметил)-амінометан гідрохлорид, кваліфікація «ч», ТУ 6-09-2477-78
4. Хлорид магнію, кваліфікація «хч», ГОСТ 4209-77
5. Гідроксид натрію, кваліфікація «чда», ГОСТ 4328-77
6. Трихлороцтова кислота (ТХО), кваліфікація «чда», ТУ 6-09-1926-77
7. Оцтовокислий натрій, кваліфікація «чда», (Хімлаборреактив, Київ)
8. Нікотинамід аденін динуклеотид фосфат (НАДФ Н₂) відновлений

РОЗЧИНИ

1. Розчин сахарози 25 ммоль, 15% розчин хлористого калію: в мірну колбу місткістю 100 мл перенести 0,85 г сахарози, зваженої з точністю до 0,01 г, додати дистильованої води та перемішати до повного розчинення сахарози. Довести розчин дистильованою водою до мітки та ще раз ретельно перемішати. До 85 мл цього розчину сахарози внести наважку 15 г хлористого калію, зваженого з точністю до 0,01 г. Перемішати до повного розчинення.
2. 40 ммоль трис (оксиметил)-амінометан гідрохлорид (рН 7,3), 16 ммоль магнію хлориду: в мірну колбу місткістю 500 мл кількісно внести наважку 5,2487 г трису, розчинити в дистильованій воді і не доводячи об'єм до мітки, виміряти рН середовища. До отриманого розчину внести наважку хлориду магнію 1,5234 г, перемішати.
3. 15% розчин ТХО: наважку ТХО 15 г, зважену з точністю 0,01 г, розчинити в 85 мл дистильованої води. Перемішати до повного розчинення.
4. 10% розчин оцтовокислого натрію: наважку 10 г зважену з точністю 0,01 г розчинити в 90 мл дистильованої води. Підігріти та перемішати розчин.
5. 0,2 М розчин гідроксиду натрію: в мірну колбу місткістю 100 мл кількісно внести наважку 0,8 г зважену з точністю 0,01 г, розчинити в дистильованій воді і, не доводячи об'єм до мітки, перемішати до повного розчинення та довести об'єм дистильованою водою до мітки.

- 4. Розчин фенолу: наважку 2,0 г фенолу, зважену з точністю 0,01 г, розчинити в 98 мл 0,2 М розчину гідроксиду натрію.
- 5. 1 мМ розчин нікотинамід аденін динуклеотид фосфату: наважку 50 мг, зважену з точністю 0,0001 г, розчинити в 2 мл дистильованої води. Розчин зберігати перед використанням.
- 6. Розчин аніліну: 0,27 мл аніліну перенести в мірну колбу місткістю 100 мл та довести об'єм до мітки дистильованою водою.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

- 1. Наважку 0,1 г промитої свіжовідібраної печічки гомогенізувати з 0,5 мл 1% розчину хлориду калію і розчином, що містить 25 ммоль сахарози.
- 2. Центрифугувати 10 хв при 3000 об/хв.
- 3. Відібрати в пробірки "дослід" та "контроль" по 0,1 мл надосадової рідини.
- 4. В пробірки "дослід" внести 0,6 мл розчину трис НСІ, 0,1 мл розчину хлориду магнію, 0,1 мл НАДФН. В пробірки "контроль" внести по 0,6 мл розчину трис НСІ, 0,1 мл розчину хлориду магнію.
- 5. В усі пробірки внести по 0,1 мл розчину аніліну.
- 6. Інкубувати 20 хв при 37°C при періодичному струшуванні.
- 7. Додати в усі пробірки по 0,5 мл розчину ТХО.
- 8. В пробірку "контроль" додати 0,1 мл розчину НАДФН.
- 9. Центрифугувати 10 хв при 3000 об/хв.
- 10. В чисті пробірки внести по 1 мл надосадової рідини, додати 0,5 мл розчину оцтовокислого натрію та 1,5 мл розчину фенолу.
- 11. Інкубувати при 37°C 30 хв.
- 12. Визначити гідроксилазну активність цитохрому P₄₅₀ при довжині хвилі 430 нм в кюветі з товщиною шару рідини 10 мм. Розрахунок: у даному випадку результати виражені в одиницях екстинкції.

Література: Современные методы в биохимии / Под ред. акад. АМН СССР Ореховича В.Н. – М.: Медицина, 1979.- 136 с.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ГЛІКОЗИЛЬОВАНОГО ГЕМОГЛОБІНУ (набір «Bio – Lachema – Test», Чехія)

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Стабільна форма глікогемоглобіну містить 1-дезоксигемоглобін-1-(N-валіл)фруктозу, яка дегідратується фосфорною кислотою з утворенням кольорового комплексу, який має максимум поглинання при 443 нм. Визначенню не заважає ні лабільна форма глікогемоглобіну, ні фетальний гемоглобін.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Пробірки центрифужні місткістю 10 мл, ГОСТ 1770-74
2. Піпетки скляні градуйовані місткістю 5 мл 2-й клас, ГОСТ 20291-74
3. Дозатор піпетковий ПІ-0,02, ТУ 64-1-332981
4. Колби мірні місткістю 50, 100, 1000 мл, ГОСТ 177-74
5. Штатив пластмасовий ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669-83
6. Мікроколориметр медичний фотоелектричний МКМФ-1, ТУ 111-1.540.08
7. Термостат ТС-80М-2, ТУ 64-1-1382-83
8. Центрифуга ОПН-8-УХЛ 42 ТУ 5.375-4260-76
9. Терези лабораторні ВЛР-200, 2-й клас, ГОСТ 19491-74
10. Терези електронні ВЛ Е -134, 2-й клас, ГОСТ 104-88

РЕАКТИВИ

1. N-метил-D-глюкаміновий буфер 2,22 ммоль (ціанід калія 1,54 ммоль ферриціанід калію 1,09 ммоль – 1 флакон)
2. Еталон гемоглобіну.
3. Трихлороцтова кислота
4. 2-тіобарбітурова кислота
5. Стандарт фруктози
6. Кислота фосфорна концентрована, класифікації «чда», ГОСТ 6-09-178
7. Натрій хлористий, класифікації «чда», ТУ 6-09-5222-85
8. Комплексонат калію

РОЗЧИНИ

1. Виготовлення робочого розчину: вміст флакону з N-метил-D-глюкаміновим буфером розчинити у 2000 мл дистильованої води. Розчин зберігати 1 місяць при температурі + 2 - + 25°C в темному місці.
2. Виготовлення розчину тіобарбітурової кислоти: вміст флакону з тіобарбітуровою кислотою розчинити в 50 мл дистильованої води. Розчин зберігати 1 місяць при температурі + 16 - + 26°C в темному місці.
3. Виготовлення калібрувальних розчинів фруктози: готувати шляхом розведення реактиву «Стандарт фруктози» дистильованою водою (концентрацією від 100 до 400 мкмоль/л). Розчин зберігати 1 місяць при температурі + 2 - + 8° С в темному місці.
4. Виготовлення розчину хлориду натрію концентрацією 0,9% (0,15 М): в мірну колбу місткістю 100 мл перенести 9,0 г хлориду натрію, зваженого на технічних терезах з точністю до 0,1 г, додати дистильованої води та перемішати до повного розчинення хлориду натрію; довести розчин дистильованою водою до мітки та ще раз ретельно перемішати. Розчин зберігати в холодильнику протягом 2 місяців при температурі +8 - +10°C.

8. Приготовлення розчину комплексонату калію: в мірну колбу місткістю 100 мл перенести 1,840 г комплексонату калію, зваженого на терезах з точністю до 0,1 г, долити дистильованої води та перемішати до повного розчинення реактиву; довести розчин дистильованою водою до мітки та ще раз ретельно перемішати. Розчин зберігати в холодильнику протягом 2 місяців при температурі +8 - +10° С.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. Кров відібрати в розчин комплексонату натрію (9:1). Визначити вміст гемоглобіну (див. «Стандартна методика визначення гемоглобіну С»).
 2. 1 мл крові центрифугувати 10 хв при 1000 об/хв. Плазму злити, або відібрати піпеткою Пастера.
 3. До еритроцитів додати 3 мл розчину хлориду натрію, суміш обережно перемішати скляною паличкою. Центрифугувати 10 хв при 1000 об/хв. Надосадову рідину відібрати.
 4. До осаду еритроцитів додати 3 мл дистильованої води, суміш інтенсивно стряхнути, залишити на 10 хв. Для подальшої роботи використовувати приготовлений гемолізат.
 5. В штатив помістити 4 ряди центрифужних пробірок із зазначенням «проба», «контроль-1», «контроль-2», «стандарт».
 6. До пробірок «проба» та «контроль-1» внести 1,5 мл гемолізату.
 7. До пробірок всього ряду внести 0,25 мл фосфорної кислоти.
 8. До пробірки «стандарт» внести 1,5 мл калібрувального розчину.
 9. 1,5 мл дистильованої води внести до пробірки «контроль-2».
 10. Перемішати вміст пробірок стряхуванням, закрити пробірки гумовими пробками з вколотою ін'єкційною голкою та нагріти на гліцеринювій бані (100 ± 1)°С на протязі 30 хв. Через 10 хв підігріву ін'єкційні голки вибняти. Після закінчення дегідратації пробірки охолодити в проточній воді або на льодяній бані.
 11. Внести в усі пробірки 0,5 мл трихлороцтової кислоти. Вміст пробірок стряхнути та центрифугувати 20 хв при 3000 об/хв.
 12. Відібрати 1 мл надосадової рідини та внести її у чисті пробірки із зазначенням «проба», «контроль-1», «контроль-2», «стандарт».
 13. Внести 0,5 мл розчину тіобарбітурової кислоти в пробірки «проба», «контроль-2», «стандарт».
 14. В пробірку «контроль-1» внести 0,5 мл дистильованої води. Перемішати вміст пробірок стряхуванням та інкубувати 40 хв при температурі + 37° С.
 15. Виміряти оптичну густину при довжині хвилі 430-450 нм, кювета 1 см проби (A₁), контролю-1 (A₂), контролю-2 (A₃) та стандарту проти дистильованої води.
- По залежності оптичних густин стандартів від концентрації калібрувальних розчинів визначити кутовий коефіцієнт sm (л/мкмоль). Вміст глікозильованого гемоглобіну (мкмоль фруктози/г Нв) обчислити за формулою:

$$\frac{A_1 - (A_2 + A_3)}{nb \times sm}$$

$$nb \times sm$$

Нормальні показники: (3,5-7,0) ммоль фруктози/г Нв
Література: Gabbay K.H. Diabetes 28, 337 (1979)

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ВІЛЬНОГО ОКСИПРОЛІНУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Колориметричне визначення, що базується на реакції піролу карбонової кислоти, яка утворюється при окисленні оксипроліну, з парм-диметиламінобензальдегідом.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Дозатори піпеткові ПІ-20-200, ТУ 64-1-3329-81
2. Мікроколориметр медичний фотоелектричний МКМФ-1, ТУ 64-1-3445-80
3. Секундомір тип СОС пр. – 26-2-000, ТУ 23-1894,-003-90
4. Терези лабораторні ВЛР-200, 2-й клас, ГОСТ 19491-74
5. Терези електронні ВЛ Е –134, 2-й клас ГОСТ 104-88
6. Термометр до 100° С ТТ ГОСТ 2823-73
7. рН - метр-мілівольметр, тип рН-150, ГОСТ 22261-82
8. Колби мірні місткістю 25, 50, 100, 1000 мл, ГОСТ 1770-74
9. Піпетки скляні місткістю 1, 2, 5, 10 мл, 2-й клас ГОСТ 20292-74
10. Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74
11. Плита електрична з зак. Сп. ЕШП-1-0,8, ГОСТ 14919-83
12. Стакани хімічні місткістю 50, 100 мл, ГОСТ 1770-74
13. Холодильник побутовий, ТУ 84-89
14. Центрифуга лабораторна ОПН-3 УХЛ 4.2, ТУ 5.375-4260-76
15. Циліндри мірні місткістю 50 мл, ГОСТ 1770-74
16. Штативи для пробірок поліетиленові ШПП 02-40 ТУ 64-1-2669-83

РЕАКТИВИ

1. п-диметиламінобензальдегід (ПДАБ), ТУ 6-09-3272-77
2. Кислота лимонна моногідрат, кваліфікація «чда» ГОСТ 3652-69
3. Кислота соляна, стандарт-титри. 0,1 н ТУ 6-09-2540-87
4. Кислота хлорна, кваліфікація «чда» ТУ 6-09-2878-73
5. Натрію ацетат трьохводний, кваліфікація «чда» ГОСТ 199-68
6. Натрію цитрат трьохзаміщений 5,5-водний, кваліфікація «чда» ГОСТ 22280-76
7. L-Оксипролін (L-4-Гідрохуполіне), ("Bio-Chemika" Fluka)
8. Пропанол-2 (спирт ізопропіловий) кваліфікація «хч» ГОСТ 9805-84

- 9. Спирт етиловий 96°, ГОСТ 5962-67
- 10. Хлорамін Б (Т) ТУ 6-09-3021-73
- 11. Мідь сірчанокисла п'ятиводна, кваліфікація "хч", ГОСТ 4165-68

РОЗЧИННИ:

1. Ацетат - цитратний буферний розчин рН 6,0: в мірну колбу місткістю 100 мл перенести 5,7 г трьохводного ацетату натрію, 3,75 г трьох-заміщеного ацетату натрію 5,5-водного, 0,85 г лимонної кислоти моногідрату, важеного на електронних терезах з точністю до 0,005 г, прилити близько 50 мл дистильованої води та перемішати до повного розчинення компонентів. Прилити до розчину 38,5 мл пропанолу-2, об'єм розчину довести дистильованою водою до мітки, добре перемішати. Зберігати в холодильнику при температурі +4 +8°С протягом шести місяців;
2. Розчин ПДАБ в хлоридній кислоті: в хімічний стакан перенести 2,0 г ПДАБ, важеного на електронних терезах з точністю до 0,005 г, прилити 3 мл хлоридної кислоти, перемішати до повного розчинення ПДАБ. Розчин зберігати в холодильнику при температурі +4 +8°С протягом одного тижня;
3. 7% розчин хлораміну: в хімічний стакан перенести 0,75 г хлораміну, важеного на електронних терезах з точністю до 0,005 г, розчинити у 10 мл дистильованої води, при підігріванні приблизно до 35°С, перемішувати до повного розчинення хлораміну. При необхідності розчин профільтрувати через фільтрувальний папір. Зберігати в холодильнику при температурі +4 +8°С протягом одного тижня;
4. Розчин соляної кислоти, 0,001 М: в мірну колбу місткістю 1000 мл налити 10 мл розчину соляної кислоти концентрації 0,1 моль/л, приготовленого з стандарт-титрів, долити дистильовану воду до мітки на мірній колбі та ретельно перемішати. Розчин стійкий, зберігати в скляній з притертою пробкою;
5. Калібратор – розчин оксипроліну 5 мкг/мл в 0,001 М соляній кислоті: уважко оксипроліну 50 мг, взяту з точністю 0,0001 г, внести в мірну колбу місткістю 500 мл, розчинити в 0,001 М соляній кислоті, об'єм довести до мітки, перемішати; 5 мл отриманого розчину внести в мірну колбу місткістю 100 мл, долити до мітки розчином соляної кислоти, перемішати. Готувати перед використанням.
6. Реактив Ерліха: безпосередньо перед використанням змішати 3 об'єми розчину ПДАБ в хлоридній кислоті з 13 об'ємами пропанолу-2;
7. Розчин окисника: безпосередньо перед використанням змішати 4 частини буферного розчину та 1 частину 7%-ного розчину хлораміну;
8. 100 % спирт: мідь сірчанокислу п'ятиводну, просушити у сухожаровій шафі при температурі 120° С до білоголубого кольору, насипати у чисту скляну пляшку з притертою пробкою, налити 96° спирт (приблизно 10 г мідного купоросу п'ятиводного, на 100 мл 96° спирту). Потім пляшку

струшувати до рівномірного розподілу порошку. По мірі поглинання води порошок здобуває сине забарвлення. Спирт перелити у другу пляшку, яка містить свіжу порцію прожареної обезвоженої сірчанокислої міді. Подібну процедуру повторити до тих пір, поки осад не перестане здобувати голубий колір. Зневоднений спирт профільтрувати у чистий посуд, який щільно закрити.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. В центрифужну пробірку "дослід" внести за допомогою дозатора піпеткового на 2-200 мкл 150 мкл сироватки або слини.
2. В іншу центрифужну "контроль" пробірку внести 150 мкл дистильованої води.
3. В усі пробірки налити за допомогою дозатора піпеткового на 100-1100 мкл по 600 мкл охолодженого 100% спирту етилового. Струснути пробірки декілька разів.
4. Центрифугувати 10 хв при 3000 об/хв.
5. В нові центрифужні пробірки перелити весь центрифугат до останньої кривої.
6. В усі пробірки внести 150 мкл пропанолу-2, перемішати.
7. Приготувати реактив Ерліха та розчин окисника.
8. В усі пробірки внести 150 мкл розчину окисника, визначаючи за допомогою секундоміра час внесення цього розчину до кожної пробірки та перемішати.
9. Рівно через 4,5 хв внести за допомогою дозатора піпеткового на 100-1100 мкл 450 мкл реактиву Ерліха до кожної пробірки, ретельно перемішати.
10. Усі пробірки вмістити на водяну баню 30 хв при температурі при 60°C.
11. Проби охолодити водопровідною водою протягом 3 хв.
12. Виміряти оптичну густину на МКМФ-1 при довжині хвилі 540 нм в кюветі з довжиною оптичного шляху 10 мм.
13. Концентрацію оксипроліну визначати по калібрувальній кривій.

ПОБУДОВА КАЛІБРУВАЛЬНОЇ КРИВОЇ

Приготувати калібратор, (розчин оксипроліну 5 мкг/мл в 0,001 М соляної кислоти).

В 5 центрифужних пробірок внести калібратор та розчин 0,001 М соляної кислоти згідно з таблицею:

№ пробірки	Об'єм каліб-ратора, мл	Об'єм розчину соляної кислоти, мл	Кінцева концентрація оксипроліну, мкг/мл
1	1	4	1
2	1	1,5	2
3	1	1	2,5
4	1	0,25	4
5	1	-	5

До кожної пробірки відібрати в чисті центрифужні пробірки по 150 мкл забарвувального розчину і проводять аналіз, починаючи з п.п. 1. За результатами аналізу побудувати калібрувальну криву в координатах оптична густина – концентрація.

Нормальні величини: 1,2-1,8 мкг/мл.

Література: Тетянєв С.С. Метод определения свободного оксипролина в сыворотке крови // Лабораторное дело. - 1985. - № 1. - С. 61-62.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ БЛІКУ В СЛИНІ МЕТОДОМ ЛОУРІ ПРИНЦИП МЕТОДУ

Метод базується на утворенні забарвлених продуктів ароматичних амінокислот та цистеїну з реактивом Фоліна в поєднанні з біуретовою реакцією на пептидні зв'язки.

МАТЕРІАЛИ І ОБЛАДНАННЯ

1. Колориметр фотоелектричний концентраційний КФК-2-УХЛ 4.2, ТУ 3-1766-82
2. Терези лабораторні ВЛР-200, 2-й клас, ГОСТ 19491-74
3. Терези електронні ВЛ Е-134, 2-й клас ГОСТ 104-88
4. Дозатори піпеткові ПІ-0,1 ПІ-0,5, ТУ 64-1-3329-81
5. Колба термостійка круглодонна місткістю 500 мл з зворотнім холодильником
6. Колби мірні місткістю 50, 100, 1000 мл, ГОСТ 1770-74
7. Колби хімічні місткістю 250, 500 мл, ГОСТ 1770-74
8. Піпетки скляні градуйовані місткістю 1, 5, мл, 2-й клас, ГОСТ 20292-74
9. Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74
10. Плита електрична з зак. сп., тип ЕПШ-1-0,8, ГОСТ 14919-836
11. Стакани хімічні місткістю 50, 100 мл, ГОСТ 1770-74
12. Холодильник побутовий, ТУ 84-89
13. Центрифуга лабораторна ОПН-3 УХЛ 4.2 ТУ 5.375-4260-76
14. Циліндри мірні місткістю 25, 50, 100 мл, ГОСТ 1770-74
15. Штативи для пробірок поліетиленові ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669-83

РЕАКТИВИ

1. Альбумін, ГОСТ 8115-73
2. Кислота ортофосфорна, кваліфікація «чда» ГОСТ 6652-80
3. Кислота фосфорно-молібденова, кваліфікація «чда» ТУ МХП НОРУ-26-55
4. Міді сульфат п'ятиводний, кваліфікація «чда» ГОСТ 4165-88
5. Натрію вольфрамат двоховодний, кваліфікація «чда» ГОСТ 18289-78
6. Натрію гідроксид, кваліфікація «чда» ГОСТ 4328-77

7. Натрію карбонат, кваліфікація «чда» ГОСТ 83-79
8. Натрію хлорид, кваліфікація «чда» ГОСТ 4233-77
9. Натрію цитрат трьохзаміщений 5,5-водний, кваліфікація «чда» ГОСТ 22280-76.

РОЗЧИНИ

1. Розчин «А». Наважку 4 г гідроксиду натрію, зважену на електронних терезах з точністю 0,005 г, кількісно перенести в мірну колбу місткістю 1000 мл і додати невелику кількість води, перемішувати до повного розчинення реактиву. Після цього в колбу внести і розчинити 20 г карбонату натрію, зваженого з тією ж точністю, додати дистильовану воду до мітки на мірній колбі та ретельно перемішати. Розчин зберігати в холодильнику при температурі +4 - +8°С в поліетиленовій тарі. При помутнінні розчин до використання непридатний;
2. Розчин «Б». Наважку 1 г сульфату міді п'ятиводного, зважену на електронних терезах з точністю 0,005 г, кількісно перенести в мірну колбу місткістю 100 мл додати дистильованої води, перемішувати до повного розчинення реактиву. В іншу мірну колбу місткістю 100 мл кількісно перенести 2 г цитрату натрію зваженого з тією ж точністю, перемішати до повного розчинення, додати дистильовану воду до мітки на мірній колбі та знов ретельно перемішати. Розчини з двох колб поєднати та перемішати. Розчин зберігати при кімнатній температурі. При помутнінні розчин до використання непридатний;
3. Робочий розчин. 1 мл розчину «Б», відміреного піпеткою скляною місткістю 1 мл з точністю до 0,01 мл, перенести в мірну колбу місткістю 50 мл та додати до мітки на мірній колбі розчин «А»; ретельно перемішати. Розчин готувати безпосередньо перед використанням;
4. Розчин гідроксиду натрію, концентрація 0,1 М. Наважку гідроксиду натрію масою 2 г, зважену на електронних терезах з точністю 0,005 г, кількісно перенести в мірну колбу місткістю 500 мл, додати невелику кількість води, перемішати до повного розчинення, додати дистильовану воду до мітки на мірній колбі та знов ретельно перемішати. Розчин зберігати в холодильнику при температурі +4 - +8°С. При помутнінні розчин до використання непридатний;
5. Розчин калібратора - розчин альбуміну, концентрація 5 мг/мл. Наважку альбуміну масою 0,25 г, зважену на лабораторних терезах з точністю 0,00005 г кількісно перенести в мірну колбу місткістю 50 мл, перемішати до повного розчинення, додати дистильовану воду до мітки на мірній колбі та знов ретельно перемішати. Розчин зберігати в холодильнику при температурі +4 - +8°С. При помутнінні розчин до використання непридатний;
6. Реактив Фоліна. В круглодонну колбу місткістю 250 мл налити 70 мл дистильованої води, відміреної за допомогою мірного циліндра на 100 мл, внести 10 г вольфрамату натрію та 2,5 г фосфорно-молібденової кислоти, зважених на електронних терезах з точністю до 0,005 г, 5 мл ортофосфornoї

зшити, відміреної скляною піпеткою місткістю 5 мл, Суміш кип'ятити з магнітним холодильником протягом 2 годин, охолодити до кімнатної температури, потім кількісно перенести в мірну колбу місткістю 100 мл, додати дистильовану воду до мітки на мірній колбі та знов ретельно перемішати. Зберігати в склянках з темного скла з притертими пробками.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. В центрифужні пробірки за допомогою дозатора піпеткового на 0,1 мл перенести 0,1 мл дослідної проби слини.

2. В центрифужну пробірку для контролю на реактиви внести 0,1 мл дистильованої води за допомогою дозатора піпеткового на 0,1 мл.

3. В усі пробірки прилити 0,4 мл розчину гідроксиду натрію за допомогою скляної піпетки місткістю 1 мл з точністю до 0,01 мл. Вміст пробірок перемішати.

4. В усі пробірки прилити 4,0 мл робочого розчину за допомогою скляної піпетки на 5 мл з точністю до 0,05 мл. Вміст пробірок перемішати; дати постояти при кімнатній температурі 5 хв.

5. В усі пробірки внести 0,5 мл реактива Фоліна за допомогою піпеткового дозатора на 0,5 мл, перемішати вміст пробірок та витримати при кімнатній температурі 30 хв.

6. Виміряти оптичну густину проби проти контролю на реактиви на КФК-фільтрі довжині хвилі 670 нм в кюветі з довжиною оптичного шляху 10 мм. Концентрацію білка визначити по калібрувальному графіку.

Побудова калібрувальної кривої. В 8 центрифужних пробірок за допомогою скляної градуйованої піпетки місткістю 5 мл внести розчин калібратора (розчин альбуміну, концентрація 5 мг/мл) і дистильовану воду згідно з таблицею:

№ пробірки	Об'єм розчину калібратора, мл	Об'єм дистильованої води, мл	Кінцева концентрація альбуміну в калібрувальному розчині, мг/мл
1	0,5	4,5	0,5
2	1,0	4,0	1,0
3	1,5	3,5	1,5
4	2,0	3,0	2,0
5	2,5	2,5	2,5
6	3,0	2,0	3,0
7	4,0	1,0	4,0
8	5,0	-	5,0

В чисті центрифужні пробірки за допомогою дозатора піпеткового на 0,1 мл внести 0,1 мл відповідного калібрувального розчину; в пробірку для контролю на реактиви – 0,1 мл дистильованої води.

Далі провести аналіз за п.п. 2 – 7 цієї методики. За результатами аналізу побудувати калібрувальну криву в координатах оптична густина – концентрація білка.

Нормальні значення: 5 - 8 г/л.

Література: 1. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. - 11-е изд., доп. - М.: Медицина, 1989. - С. 31-126. - 2. Клиническая оценка биохимических показателей в заболеваниях внутренних органов / Под ред. Передерия В.Г., Хмелевского Ю.В. - Київ: "Здоров'я", 1993. - С.130-131.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ХЛОРУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ТА СЕЧІ МЕРКУРИМЕТРИЧНИМ ТИТРУВАННЯМ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Хлор в біологічних рідинах визначають титруванням розчином пітрату ртуті. В точці еквівалентності надлишок пітрату ртуті утворює з індикатором – дифенілкарбазоном – комплексну сполуку, що має фіолетове забарвлення.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Дозатор піпетковий П1-50, П1-100, ТУ 64-1-3329-81
2. Терези лабораторні ВЛР-200, 2-й клас, ГОСТ 19491-74
3. Терези електронні ВЛ Е -134, 2-й клас, ГОСТ 104-88
4. Лійка скляна, ГОСТ 1770-74
5. Колба мірна місткістю 100, 1000 мл, ГОСТ 1770-74
6. Мікробюретка місткістю 2 мл з ціною поділки 0,01 мл, ТУ 64-2-4011-81
7. Папір універсальний індикаторний, ТУ 6-09-1181-76
8. Піпетка скляна градуйована місткістю 1, 10 мл, 2-й клас, ГОСТ 20292-74
9. Стакан хімічний місткістю 50, 100 мл, ГОСТ 1770-74
10. Циліндри мірні місткістю 25, 100 мл, ГОСТ 1770-74
11. Флакони пеніцилінові.

РЕАКТИВИ

1. Дифенілкарбазон (індикатор), ТУ 6-09-5215-85
2. Кислота азотна концентрована, кваліфікація «чда» ГОСТ 4461-77
3. Натрію хлорид, кваліфікація «чда» ГОСТ 4233-77
4. Ртуть азотнокисла двохводна, кваліфікація «хч» ГОСТ 4520-78
5. Спирт етиловий 96°, ГОСТ 5962-67

РОЗЧИНИ

1. Розчин азотної кислоти, концентрація 2 моль/л. 14 мл концентрованої азотної кислоти, відміреної за допомогою мірного циліндра місткістю 25 мл, перенести до мірної колби місткістю 100 мл, долити невелику кількість дистильованої води, перемішати, довести розчин у колбі дистильованою водою до мітки та знов ретельно перемішати. Розчин стійкий

Розчин азотнокислої ртуті. Наважку азотнокислої ртуті масою 2 г, зважену з точністю 0,005 г, кількісно перенести до мірної колби місткістю 100 мл, розчинити приблизно в 200 мл дистильованої води, додати 20 мл розчину азотної кислоти, відміреного за допомогою мірного циліндра об'ємом 25 мл, довести об'єм дистильованою водою до мітки на колбі та ретельно перемішати. Розчин стійкий.

Розчин індикатора. Наважку дифенілкарбазону масою 0,1 г, зважену з точністю 0,005 г, розчинити в 100 мл спирту етилового. Розчин індикатора зберігати в холодильнику при температурі +4 - +8°C протягом 1 місяця в скляній з темного скла.

Розчин калібратора – розчин хлориду натрію, концентрація 10 мМ. Наважку хлориду натрію, висушеного до постійної маси при 120° С, зважену з точністю до 0,0001 г, кількісно перенести в мірну колбу місткістю 100 мл, розчинити в дистильованій воді, довести об'єм розчину до мітки та ретельно перемішати. Зберігати в холодильнику при температурі +4 - +8°C. При помутнінні розчин до використання непридатний.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

В пеніцилінові флакони місткістю 10 мл налити 0,9 мл дистильованої води, відміреної скляною градуйованою піпеткою на 1,0 мл.

За допомогою піпеткового дозатора на 0,1 мл прилити 0,1 мл біологічної рідини, що досліджується.

В пеніцилінові флакони внести 1 мл розчину калібратора за допомогою скляної градуйованої піпетки на 1,0 мл.

В усі флакони прилити 0,05 мл розчину індикатора.

Всі проби титрувати розчином азотнокислої ртуті, користуючись мікробюреткою, до блідо-фіолетового забарвлення.

Розрахунок вмісту хлору в біологічній рідині вести за формулою:

$$C_{\text{м(сб)}} = \frac{0,01 \cdot V_0}{V_k} \cdot 10^4,$$

де $C_{\text{м(сб)}}$ – вміст хлору в біологічній рідині, ммоль/л;

0,01 – вміст хлору в розчині калібратора, що титрується, ммоль;

V_0 – об'єм розчину азотнокислої ртуті, що затрачений на титрування послідної проби, мл;

V_k – об'єм розчину азотнокислої ртуті, що затрачений на титрування розчину калібратора, мл;

10^4 – коефіцієнт перерахунку на 1 л біологічної рідини.

Примітка. Перед визначенням вмісту хлору в сечі необхідно перевірити рН за допомогою універсального індикаторного паперу. Якщо рН більше 8, то сечу підкислити до слабо-кислої реакції.

Нормальні значення: вміст хлору в сироватці здорових коливається в межах 95-120 ммоль/л, в сечі – 170-210 ммоль/л.

Література: Методические указания по применению унифицированных клинических лабораторных методов исследования / Под ред. проф. Меньшикова. – М.: Медицина, 1973. – С. 101-102.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ТРИГЛІЦЕРИДІВ (набір «Біо – ЛАСНЕМА – Тест», Чехія)

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Тригліцериди омилюються гідроокисом калію в гліцерин, при окисненні якого утворюється формальдегід. Формальдегід визначають по реакції з метилацетоном і амонієвими іонами, як жовтий 3,5-діацетил-4-гідролутидин.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Пробірки центрифужні місткістю 10 мл, ГОСТ 1770-74
2. Піпетки скляні градуйовані місткістю 1 мл, 5 мл 2-й клас, ГОСТ 20291-74
3. Дозатор піпетковий ПІ-0,1, ПІ-0,5, ТУ 64-1-3329-81
4. Штатив пластмасовий ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669-83
5. Мікроколориметр медичний фотоелектричний МКМФ-1, ТУ 11-1-540.008
6. Термостат ТС-80М-2, ТУ 64-1-1382-83
7. Центрифуга ОПН-8-УХЛ 42, ТУ 5. 375-4260-76

РЕАКТИВИ

1. Стандартний розчин триолеїну 3,39 ммоль/л в ізопропиловому спирті
2. Ацетилацетон 0,75 г/л в розчині 20% ізопропилового спирту
3. Окислювальний розчин KJO_4 5,5 ммоль/л в ацетатному буфері
4. Калій гідроокис, розчин 1 моль/л
5. Ізо-пропиловий спирт
6. Адсорбент

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. Поставити у штатив пробірки (пронумерувати по кількості проб, контрольний розчин, стандарт)
2. В пронумеровані пробірки для проб, внести 0,1 мл сироватки крові.
3. В пробірку з зазначенням «стандарт» внести 0,1 мл стандартного розчину триолеїну 3,39 ммоль/л в ізопропиловому спирті.
4. В пробірку з зазначенням «контроль» внести 0,1 мл дистильованої води
5. В усі пробірки долити 4 мл ізопропилового спирту.

9. Мірною ложкою в усі пробірки додати 0,4 г адсорбенту. Перемішати.
10. Центрифугувати протягом 10-15 хв.
11. Центрифугувати 5 хв при 3000 об/хв.
12. Повернути 2,0 мл надосадової рідини та внести її у чисті пробірки із зазначенням проб та зазначенням «контроль», «стандарт».
13. У кожну пробірку додати 0,5 мл 1 моль/л розчину калію гідрооксиду.
14. Перемішати, закрити пробками. Інкубувати 5-10 хв. при $60 \pm 2^\circ\text{C}$.
15. Охолодити пробірки 5 хв у холодній воді, в усі пробірки внести 0,5 мл 10% повільного розчину.
16. Залишити на 10 хв при кімнатній температурі, потім внести в усі пробірки 0,5 мл ацетилацетону. Вміст пробірок перемішати.
17. Інкубувати 30 хв при температурі $60 \pm 2^\circ\text{C}$. Охолодити.
18. Виміряти оптичну густину проб (А₁), «стандарту» (А₂) проти розчину пробірки із зазначенням «контроль».
19. Вміст тригліцеридів (ммоль/л) в сироватці крові обчислити за формулою:

$$3,39 \cdot A_1 / A_2$$
20. Нормальні величини: (0,45-1,86) ммоль/л
21. Література: 1. Fletcher M.J., Clin. Chim. Acta 22, 393 (1968). – 2. Chromy V, J. Dobkovc M., Breinek P., Vrublovskc H.: Biochem. clin. bohemoslov. 6, 167 (1977).

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ЦИТОХРОМОКСИДАЗИ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

В основі методу лежить реакція б-нафтолу-диметилпарафенилендіаміну (НАД(П)) з утворенням голубого індофенолу, інтенсивність елюйованого забарвлення прямо пропорційна активності ферменту.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Пробірки хімічні, ГОСТ 25336-82
2. Піпетки скляні градуйовані місткістю 2, 10 мл, 2-й клас, ГОСТ 20292-74
3. Дозатор піпетковий П1-0,1, ТУ 64-1-3329-81
4. Колби мірні місткістю 500, 1000 мл, ГОСТ 1770-74
5. Циліндр мірний місткістю 50 мл, ГОСТ 1770-74
6. Ножиці очні гострокінцеві, ТУ 64-1-64-78
7. Пінцет анатомічний, ТУ 64-1238-78
8. Штатив пластмасовий ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669-83
9. Поток для льоду
10. Ступка фарфорова, діаметр 40x30 мм
11. рН-метр-мілівольтметр, тип рН-150, ГОСТ 22261-82
12. Ваги торсійні ВТ-500, ТУ 64-1-990-81

13. Секундомір тип СОСпр.-26-2-000, ТУ 23-1894.003-90,
14. Термостат ТС-80М-2, ТУ 64-1-1382-83
15. Холодильник побутовий, ТУ 84-89
16. Колориметр фотоелектричний концентраційний КФК-2-УХ 111
3-3.1766-82
17. Терези електронні ВЛ Е -134, 2-й клас, ГОСТ 104-88

РЕАКТИВИ

1. α -нафтол, ("Sigma", США)
2. N,N -диметил-пара-фенілендіамін гідрохлорид, ("Sigma", США)
3. Цитохром С, ("Sigma", США)
4. Фосфат натрію двозаміщений, безводний, кваліфікація "чда", ГОСТ
2493-75
5. Фосфат калію однозаміщений, безводний, кваліфікація "ч", ГОСТ
4198-75
6. Ефір для наркозу стабілізований (м. Шостка, Україна)
7. Спирт етиловий 96°, ГОСТ 5962-67.

РОЗЧИНИ

1. 0,1 М буферний розчин, рН 7,6: в мірну колбу місткістю 1000 мл
перенести 12,78 г фосфату натрію двозаміщеного, безводного, зваженого
на електронних вагах з точністю до 0,005 г, долити 500 мл дист. води
перемішати до повного розчинення. Додати 1,36 г фосфату калію
однозаміщеного, безводного зваженого на електронних вагах з точністю
до 0,001 г, перемішати до повного розчинення. Долити дистильовану воду
майже до мітки та повторно перемішати. Залишити розчин при кімнатній
температурі на 1 годину. Перевірити рН розчину і в разі необхідності
довести рН до значення 7,6. Перед аналізом буфер розбавити у 4 рази.
Зберігати у холодильнику при (+8-+10)°С протягом місяця.
2. Розчин α -нафтолу 0,1% на 22% етанолі: 10 мг α -нафтолу розчинити у 20
мл етанолу та долити 7,7 мл дистильованої води. Готувати перед роботою.
3. Розчин N,N -диметил-пара-фенілендіамін гідрохлориду 0,1%: 30 мг
 N,N -диметил-пара-фенілендіамін гідрохлориду розчинити в 30 мл
дистильованої води. Готувати перед роботою.
4. Розчин цитохрому С 0,02%: 2 мг цитохрому С розчинити в 10 мл
дистильовану води. Готувати перед використанням.
5. Ефіралкогольну суміш готувати перед використанням шляхом злиття
рідин в об'ємному співвідношенні 9:1.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. 0,1 г тканини гомогенізувати в 0,9 мл розбавленого охолодженого фосфатного
буферу. Гомогенат об'ємом 1,0 мл перенести в пронумеровані хімічні пробірки

В пробірку із зазначенням "контроль" внести 1 мл розведеного стандартного буферу.

Далі потрібно приготувати реакційну суміш злиттям (пропорційно кількості пробірочок) об'єми 0,25 мл 0,1% б-нафтолу, 0,35 мл 0,1% розчину метил-пара-фенілендіамін гідрохлориду, 0,25 мл розведеного стандартного буферу, 0,15 мл 0,02% розчину цитохрому С. Проінкубувати суміш 2 хв при 37° С.

Внести до контролю та дослідних проб 1 мл реакційної суміші. Інтенсивність забарвлення виміряти. Інкубувати 5 хв при 37°С (по секундоміру).

Після інкубації в пробірки долити 10 мл ефірально-спиртової суміші, закрити пробками, стряхнути, помістити в холод (-4°С) на 30 хв. Періодично встряхувати. Забарвлення осаду поступово переходить до розчинника.

На осадову рідину фотометрувати при довжині хвилі 540 нм, кювета 10 мм, проти контролю на реактиви. Активність цитохромоксидази виміряти за формулою:

$$A = \frac{2E_{пр}}{E_{ст}}$$

А – активність цитохромоксидази в індофенольних одиницях на грам тканини за хв.;

$E_{ст}$ – екстинкції дослідної проби та стандарту, при чому стандарт в концентрації 100 мкг/мл б-нафтолу (1 мл в суміші) можна прирівняти до умовної одиниці, пропорційної кількості індофенолу.

Література: Straus W. Calorimetric microdetermination of cytochrom oxydase The Journal of Biological Chemistry.-1954.-Vol. 207, №2. – P.733 – 743.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ СПОНТАННОГО ГЕМОЛІЗУ ЕРИТРОЦИТІВ ПРИНЦИП МЕТОДУ

Для оцінки фізико-хімічних властивостей еритроцитів досліджували їх стійкість (резистентність) при інкубації в фосфатному буферному розчині (рН 7,4) протягом 4 годин при температурі + 37° С. Гемоліз обумовлений продовженням пероксидного окислення фосфоліпідів мембран.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Дозатор автоматичний поршневий медичний А-2, ТУ 64-1-2828-81
2. Дозатори піпеткові ПІ-0,1, ПІ-1,0, ТУ 64-1-3329-81
3. Колориметр фотоелектричний концентраційний КФК-2-УХЛ 4.2., ТУ 3.1766-82

4. Терези електронні ВЛ Е-134, ГОСТ 24104-88
5. рН – метр-мілівольтметр, тип рН-150, ГОСТ 22261-82
6. Колба мірна місткістю 1000 мл, ГОСТ 1770-74
7. Піпетка скляна градуйована місткістю 10 мл, 2-й клас, ГОСТ 20191-81
8. Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74
9. Термостат ТС-80 М, ТУ 64-1-1382-83
10. Центрифуга лабораторна ОПН-3 УХЛ 4.2, ТУ 5.375-4260-76
11. Штативи для пробірок поліетиленові ШПП 02-40, ТУ 64-1-2669-81

РЕАКТИВИ

1. Калій фосфорнокислий однозаміщений зневоднений, кваліфікація «чда», ГОСТ 4198-75
2. Натрію гідроксид, кваліфікація «чда», ГОСТ 4328-77
3. Натрію хлорид, кваліфікація «чда» ТУ 6-09-5222-85

РОЗЧИНИ

1. Буферний розчин рН 7,4. В мірну колбу місткістю 1000 мл, в яку налити близько 500 мл дистильованої води, необхідно перенести 5,17 г однозаміщеного фосфорнокислого калію зневодненого, 8,5 г хлориду натрію; 1,5 г гідроксиду натрію. Переносити у колбу наступний реактив лише після повного розчинення попереднього. Долити дистильовану воду майже до мітки на мірній колбі і залишити розчин при кімнатній температурі на одну годину. Після цього вимірювати рН розчину і в разі необхідності довести рН до значення 7,4 обережно, невеликими порціями додаючи розчин гідроксиду натрію, якщо рН менше 7,4, або однозаміщеного фосфорнокислого калію зневодненого, якщо рН більше 7,4. Дистильованою водою довести об'єм розчину до мітки на мірній колбі та ретельно перемішати. Розчин зберігати в холодильнику протягом 1 місяця при температурі +8 - +10°C. Реактиви зважувати на терезах з точністю до 0,01 г.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. В поліетиленовий штатив для пробірок помістити чотири ряди центрифужних пробірок, на яких написаний номер проби. Кількість пробірок в ряду відповідає кількості проб, що підлягають аналізу.
2. В перший ряд пробірок за допомогою дозатора автоматичного, або скляної піпетки місткістю 10 мл налити 7,5 мл буферного розчину, в другий та третій ряд - 4 мл буферного розчину, а в четвертий ряд - 4 мл дистильованої води.
3. В перший ряд пробірок за допомогою піпеткового дозатора додати по 0,1 мл крові, обережно перемішати та центрифугувати при 1500 об/хв протягом 10 хв.
4. Рідину над осадом еритроцитів злити, а до осаду долити 7,5 мл буферного розчину, легко перемішати до утворення однорідної суміші (суспензії).

з допомогою піпеткового дозатора або скляної піпетки в пробірки 2, 3, 4-ї покласти по 1 мл суспензії еритроцитів. Суспензію еритроцитів весь час перемішувати.

Пробірки з 2-м, 3-м, 4-м рядами пробірок поставити в термостат для інкубації при температурі 37° С протягом 4 годин, періодично струшуючи пробірки кожні 30 хв.

Після закінчення інкубації пробірки 2-го, 3-го рядів центрифугувати з швидкістю 1500 об/хв протягом 10 хв.

Виміряти оптичну густину розчинів, що знаходяться в пробірках 2-го, 3-го, 4-го рядів, на КФК-2 або КФК-2МП в кюветі з довжиною оптичного шляху 10 мм при довжині хвилі 540 нм проти води.

Густину гемолізу обчислювати за формулою:

$$\% \text{ гемолізу} = \frac{E_{n1} + E_{n2}}{2} \cdot \frac{100}{E_k}$$

де $(E_{n1} + E_{n2}) / 2$ - середньоарифметичне значення оптичної густини між двома паралельними дослідними пробами;

E_k - оптична густина рідини, де знаходиться проба крові в дистильованій воді;

K - коефіцієнт перерахунку на відсоток.

Результати виражаються в відсотках гемолізу.

Нормальні показники: $2,33 \pm 0,16 \%$

Література: Спиричев В.В., Матусис И.И., Бронштейн Л.М. Витамин Е / Экспериментальная витаминология. Минск: Наука и техника, 1979. - С. 18-57.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ НЕОРГАНІЧНОГО ФОСФОРУ У СИРОВАТЦІ КРОВІ АБО СЕЧІ (набір "Біо-Ласбета-Тест", Чехія)

ПРИНЦИП

Фосфорна кислота взаємодіє в кислому середовищі з ванадатом і молібдатом амонію з утворенням фосфорнованадневомолібденової кислоти жовтого кольору. Концентрацію неорганічного фосфору у сироватці крові або сечі визначають після осадження білків.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74

2. Піпетки скляні мірні градуйовані 1, 2, 10 мл, ГОСТ 202 92-74

3. Циліндри мірні 25, 100 мл, ГОСТ 1770-74
4. Центрифуга ОПН-3 УХЛ ТУ-4.2 5. 375-4260-76
5. Спектрофотометр СФ-46 (Ломо, Росія), ТУ 3-3. 1841-84

РЕАКТИВИ

1. Калій фосфорнокислий однозаміщений, кваліфікація "чда" ГОСТ 4198-65
2. Кислота трихлортова (ТХО) (M=163,5), кваліфікація "чда", ТУ 6-01-1926-77
3. Амонію ванадат (метаванадат амонію) NH_4VO_3 (M=117)
4. Амонію молібдат $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (амонію молібденовокислий водний (M=1235,9), кваліфікація "хч" ГОСТ 3765-71).

РОЗЧИНИ

1. Еталонний розчин фосфору 5 ммоль/л
2. Кислота трихлортова, 1,47 моль/л
3. Амонію ванадат, 2 ммоль/л (234 мг/л)
4. Амонію молібдат, 30 ммоль/л (37,104 г/л)
5. Робочий розчин: 1 частину розчину амонію ванадата змішати з 1 частинною розчину амонія молібдата. Готувати перед використанням
6. Калібрований стандартний розчин фосфору - 2,5 ммоль/л. Готувати розведенням еталонного розчину дистильованою водою у співвідношенні 1:1.
7. Розчин ТХО: 50 мл розчину ТХО 1,47 ммоль/л змішати з 10 мл дистильованої води.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. У центрифужні пробірки "дослід", "контроль", "стандарт" внести по 0,75 мл дистильованої води.
2. Додати у пробірки "дослід", "контроль", "стандарт" відповідно по 0,1 мл сироватки крові (сечі, яка розведена 1:4), дистильованої води стандартного розчину фосфору.
3. У всі пробірки внести по 1 мл розчину ТХО.
4. Вміст пробірок перемішати, витримати 5 хв, проби "дослід" центрифугувати при 3000 об/хв протягом 10 хв.
5. У нові пробірки "дослід", "контроль", "стандарт" внести відповідно по 1 мл супернатанту, вмісту проби "контроль" та "стандарт".
6. У всі пробірки додати по 1,2 мл робочого розчину, перемішати.
7. Витримати при кімнатній температурі 20 хв.
8. Виміряти оптичну густину проб "дослід" та "стандарт" проти проби "контроль" при довжині хвилі 400 нм у кюветі 1 см.

Розрахунок

$$P = 2,5 \times \frac{E_{\text{проб}}}{E_{\text{станд}}} \text{ ммоль / л, де}$$

концентрація фосфору у стандартному розчині, ммоль/л;

екстинкція проби “дослід”;

екстинкція проби “стандарт”.

Досліджені сечі, розведеної 1:4, результат необхідно помножити

Нормальні величини у сироватці: дорослі – 0,81-1,48 ммоль/л;

підліткового віку – 1,45-1,78 ммоль/л;

дитячого віку – 1,45-2,16 ммоль/л;

новонароджені – 1,13-2,78 ммоль/л.

Примітка: рекомендовано посуд мити хромовою сумішшю.

Література: I. Kitson, R.E, Mellon, M.G.: Anal. Chemal. 16,379 (1944), – 2. Ma,

Mckinley, J.D.: Microchim. Acta 4 (1953)

СТАНДАРНА МЕТОДИКА СПЕКТРОФОМЕТРИЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ГІДРОПЕРЕКИСЕЙ ЛІПІДІВ (ГПЛ) У ПЛАЗМІ (СИРОВАТЦІ) КРОВІ АБО ТКАНИНАХ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Метод заснований на екстракції класів ліпідів сумішшю гептан-пропанол та визначення їх концентрації шляхом вимірювання ультрафіолетового поглинання ліпідних екстрактів, максимум поглинання яких спостерігається: для жирних кислот – при шляху хвилі 14 нм

для дієнових кон'югатів (ДК) – 232-234 нм

для триєнових кон'югатів (ТК) – 268 нм

для оксодієнових кон'югатів (ОДК) - 276 нм

для тетраєнових кон'югатів (ТК) - 287 нм

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

Пробірки хімічні, ГОСТ 25336-82

Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74

Ступка фарфорова

4. Дозатор піпетковий ПІ-0,2, ТУ 64-1-3329-81
5. Піпетки мірні скляні градуйовані 1, 5 мл, ГОСТ 20292-74
6. Терези електронні ВЛ Е – 134, ГОСТ 24104-88.
7. Спектрофотометр СФ-46 (Ломо, Росія), ТУ 3-3. 1841-84
8. рН-метр-мілівольтметр, тип рН-150, ГОСТ 22261-82
9. Штатив для пробірок пластмасовий ШПП – 02-40 ТУ 64-1-2669-84
10. Секундомір тип СОС пр.- 26-2-000. ТУ 23-1894. 003-90

РЕАКТИВИ

1. Калій фосфорнокислий однозаміщений, кваліфікація “чда” ГОСТ 4198-65
2. Натрій фосфорнокислий двоаміщений, кваліфікація “чда” ТУ 64-61-10
3. Гептан, кваліфікація “хч” ГОСТ 25828-83
4. Ізопропанол, кваліфікація “хч” ГОСТ 9805-84
5. Кислота соляна концентрована, кваліфікація “ч” ГОСТ 3118-77

РОЗЧИНИ

1. Фосфатний буфер, рН 7,4: 1,18 г/л калію фосфорнокислого однозаміщеного та 4,30 г натрію фосфорнокислого двоаміщеного кількісно перенести у мірну колбу місткістю 1 л, розчинити у дистильованій воді, довести до мітки, перемішати.
2. Суміш гептан-ізопропанол: змішати гептан та ізопропанол у рівних об'ємах.
3. Розчин 0,1 н соляної кислоти. Готувати із стандарт-титрів. В мірну колбу місткістю 1000 мл перенести вміст ампули стандарт-титру соляної кислоти (0,1 н). Ампулу добре промити дистильованою водою збираючи промивні води в мірну колбу. Вміст колби перемішати, додати розчин дистильованою водою до мітки на колбі та ще раз добре перемішати. Розчин стійкий, зберігати у склянці з притертою пробкою при кімнатній температурі.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

Для аналізу тканини приготувати 10 % розчин гомогенату тканини на фосфатному буфері: 100 мг тканини, зваженої з точністю 0,005 г розтерти у форфоровій ступці з 0,9 мл фосфатному буфері до гомогенного стану.

1. У хімічну пробірку “дослід” помістити 0,2 мл плазми (сироватки) крові або гомогенату тканини. У пробірку “контроль” – 0,2 мл дистильованої води або фосфатного буфера (у випадку використання тканини).
2. У всі пробірки прилити 4 мл суміші гептан-ізопропанол.
3. Пробірки інтенсивно струшувати протягом 15 хв.
4. У кожну пробірку додати 1 мл 0,1 М соляної кислоти і 2 мл гептану.

- Вимірювати інтенсивно струшувати пробірки 1 хв.
- Вміст хімічної пробірки перелити у центрифужну пробірку і залишити на 30 хв.
- Обережно, за допомогою скляної піпетки, не наближуючись до границі розчину, відібрати у іншу чисту пробірку 2,5-3 мл верхнього гептанового шару.
- Виміряти оптичну густину верхнього гептанового шару на спектрофотометрі при вказаних вище довжинах хвиль проти пробі "контроль".
- Для розрахунку ДК, ТК, ОДК використовують наступні коефіцієнти молярної екстинкції ϵ :
- ДК - $\epsilon_{\lambda = 212} = 27000$ л/моль · см
- ТК - $\epsilon_{\lambda = 268} = 43400$ л/моль · см
- ОДК - $\epsilon_{\lambda = 276} = 22000$ л/моль · см

Розрахунок

Вміст кон'югату в плазмі сироватки крові складає:

$$C = \frac{E_{\lambda} \times V_{\text{гепт}}}{\epsilon_{\lambda} \times V_{\text{плазм}}} \text{ ммоль/мл, де}$$

- C – вміст кон'югату у плазмі (сироватці) крові, ммоль/мл;
- E_{λ} – екстинкція пробі, яка виміряна при довжині хвилі λ ;
- ϵ_{λ} – коефіцієнт молярної екстинкції при довжині хвилі, (моль⁻¹ см⁻¹);
- оптична густина розчину, який містить 1 моль/л речовини і який знаходиться у кюветі 1 см)
- $V_{\text{гепт}}$ – об'єм гептанового шару, дорівнює 4 мл;
- $V_{\text{плазм (серов)}}$ – об'єм зразку, який взятий для визначення, дорівнює 0,2 мл.
- Після переутворення:

$$C = \frac{E_{\lambda}}{\epsilon_{\lambda}} \times \frac{4}{0,2} = 20 \times \frac{E_{\lambda}}{\epsilon_{\lambda}}$$

$$C = 20 \frac{E_{\lambda}}{\epsilon_{\lambda}} \text{ моль/л} = 2 \times 10^4 \frac{E_{\lambda}}{\epsilon_{\lambda}} \frac{\text{мкмоль}}{\text{мл}}$$

Література: Гаврилов В.Б., Мишкорудная М. И. Спектрофотометрическое определение содержания гидропероксидов липидов в плазме крови. // Лаб. дело. - 1983. - № 3. - С. 33-35.

РОЗДІЛ 5. МЕТОДИ ПРОВЕДЕННЯ ЦИТОХІМІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ОЦІНКИ РЕЗУЛЬТАТІВ ЦИТОХІМІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Цитохімічні дослідження засновані на використанні специфічних хімічних реакцій для визначення в клітинах різних речовин. Це дає змогу вивчити локалізацію та орієнтовно оцінювати кількість речовин у різних клітинних елементах. Використовують напівкількісну оцінку результатів за принципом Астальді, побудованого на визначенні різного ступеня інтенсивності специфічного забарвлення.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

В залежності від ступеня забарвлення всі дослідні елементи розподіляють на 4 групи:

- а) з негативною реакцією (-);
- б) з слабопозитивною реакцією (+);
- в) з позитивною реакцією (++);
- г) з різко позитивною реакцією (+++).

Для кількісного вираження результатів підраховують 100 клітин визначеного виду, розподіляючи їх за наведеним принципом. Потім число клітин з однаковою інтенсивністю забарвлення множать на відповідну для даної групи кількість плюсів:

$$a \times 0 + b \times 1 + v \times 2 + r \times 3 \text{ од.}$$

Більш сучасним є розрахунок середнього цитохімічного коефіцієнта (СЦК) за L. Karlow, для цього величину отриману при попередньому розрахунку ділять на 100:

$$a \times 0 + b \times 1 + v \times 2 + r \times 3 \text{ од.} / 100$$

У тих випадках коли речовини, що досліджуються, локалізуються в клітинах у вигляді окремих гранул, результат цитохімічної реакції краще виражати у відсотках клітин, що мають позитивну реакцію.

Література: 1. Astaldi G., Verga L. The Glycogen Content of the Cells of Lymphatic Leukaemia // Acta haematologica. - 1957. - V. 17, N 3. - P. 129-136. - 2. Karlow L. // Blood. - 1955. - V. 10, N 10. - P. 1023-1029.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ЦИТОХІМІЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ РНК

ПРИНЦИП МЕТОДУ

По методу Браше РНК визначають шляхом порівняння 2-х препаратів, перший з яких оброблений розчином РНК-ази, а другий мазок обробляють метиловим зеленим піроніном, який забарвлює РНК в рожевий або світло-рожевий колір.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Хімічні стакани, ГОСТ 1770-74
2. Мірні циліндри місткістю 100, 1000мл, ГОСТ 1770-74
3. Піпетки скляні градуйовані місткістю 1, 5, 10 мл, ГОСТ 20295-74
4. Мірні колби місткістю 100, 500 мл, ГОСТ 1770-74
5. Дощильні лійки ВД-1-100
6. Термостат ТС-80 М, ТУ 64-1-1382-83
7. Терези електронні ВЛ Е-134, ГОСТ 24104-88
8. рН-метр-мілівольтметр, тип рН-150, ГОСТ 22261-82
9. Мікроскоп біокулярний Биолам Р11, (Ломо, Росія)
10. Предметні скельця, ГОСТ 9289-59

РЕАКТИВИ

1. Барвник піронін, кваліфікація «чда», ТУ 6-09-2047-79
2. Метиловий зелений, ГОСТ 5853-51
3. Хлороформ, кваліфікація «ч», ТУ 6-09-06-800-76
4. Льодяна оцтова кислота, кваліфікація «хч», ГОСТ 6175
5. Натрій оцтовокислий, кваліфікація «ч», ТУ 6-09-246-84
6. РНК-аза, ("Reanal", Hungary)

РОЗЧИНИ

1. Барвник метиловий зелений піронін:

Розчин А: 5% водний розчин піроніну: 5 г піроніну, зваженого на електронних терезах з точністю до 0,005 г розчинити в мірній колбі місткістю 100 мл, перемішати. 2% розчин метилового зеленого: 2 г метилового зеленого, зваженого на електронних терезах з точністю до 0,005 г розчинити в мірній колбі місткістю 100 мл, перемішати.

Змішати в мірній колбі місткістю 250 мл 15,5 мл розчину піроніну і 10 мл метилового зеленого, довести об'єм дистильованою водою до мітки, перемішати.

Очистка метилового зеленого: в ділильну лійку налити 2 % водний розчин метилового зеленого, зверху додати хлороформ, струшувати 30-

40 хв. Вилити забарвлений шар хлороформу. Процедуру повторити до знебарвлення хлороформу.

Розчин Б: 0,2 М ацетатний буфер, рН 4,8.

0,2 М розчин оцтової кислоти: 1,2 мл льодяної оцтової кислоти перенести в мірну колбу місткістю 1000 мл, довести об'єм дистильованою водою до мітки, перемішати.

0,2 М розчин ацетату натрію: 16,4 г натрію оцтовокислого перенести в мірну колбу місткістю 100 мл, довести об'єм дистильованою водою до мітки, перемішати.

Змішати 40 мл 0,2 М розчину оцтової кислоти та 60 мл 0,2 М розчин ацетату натрію. Перемішати, перевірити рН середовища.

Перед використанням розчини А і Б змішати в рівних кількостях.

0,1% водний розчин РНК-ази: готувати перед використанням. Зберігати 2-3 доби на холоді.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. Мазок фіксувати в рідині Карнуа 10 хв.
2. Промити в 2-3-х змінах дистильованої води.
3. Фарбувати метиловим зеленим піроніном 10-20 хв.
4. Швидко ополоснути дистильованою водою (15 сек.) Другий мазок обробити РНК-азою.
5. Мазок помістити в розчин РНК-ази на 30 хв в термостаті при температурі 37°C.
6. Старанно промити дистильованою водою.
7. Фарбувати метиловим зеленим піроніном 10-20 хв.
8. Швидко ополоснути дистильованою водою.

Література: 1. Основы гистологии с гистологической техникой / О.В.Волкова, Ю.К.Елецкий.- М.: Медицина, 1971.- С. 245. – 2. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования / Под ред. проф. Е.А.Косиной.- М.: Медицина, 1975.- С. 170.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ЦИТОХІМІЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ СІДЕРОБЛАСТІВ І СІДЕРОЦИТІВ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Використання реакції берлінської лазурі з утворенням в цитоплазмі клітин зернин синього кольору.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Хімічні стакани, ГОСТ 1770-74
2. Мірні циліндри місткістю 100, 1000мл, ГОСТ 1770-74
3. Піпетки скляні градуйовані місткістю 1, 5, 10 мл, ГОСТ 20295-74

- 1. Мірні колби місткістю 100, 500 мл, ГОСТ 1770-74
- 2. Термостат ТС-80 М, ТУ 64-1-1382-83
- 3. Терези електронні ВЛ Е-134, ГОСТ 24104-88
- 4. Мікроскоп бінокулярний Биолам Р11, (Ломо, Росія)
- 5. Подяна баня
- 6. Предметні скельця, ГОСТ 9289-59

РЕАКТИВИ

- 1. Метилловий спирт, ГОСТ 6995-77
- 2. Кислота соляна концентрована, кваліфікація «ч» ГОСТ 3118-77
- 3. Феррохлоридистий калій, кваліфікація «хч» ГОСТ 4206-40
- 4. Сафранін («Chemapol», Чехія)

РОЗЧИНИ

- 1. 1% розчин залізохлоридистого калію. В мірну колбу місткістю 100 мл внести 1 г залізохлоридистого калію, зваженого на електронних терезах з точністю до 0,005 г, додати близько 50 мл дистильованої води. Ретельно перемішати. Долити водою до мітки. Зберігати в темному прохолодному місці.
- 2. 0,1 н розчин соляної кислоти: 8,2 мл концентрованої соляної кислоти додати дистильованою водою до 1 л.
- 3. 0,1% розчин сафраніну. В мірну колбу місткістю 100 мл внести 0,1 г сафраніну, зваженого на електронних терезах з точністю до 0,005 г, додати близько 50 мл дистильованої води. Ретельно перемішати. Довести дистильованою водою до мітки. Зберігати в темному прохолодному місці.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

- 1. Мазки фіксувати метанолом 10-20 хв.
- 2. Висушити препарати на повітрі.
- 3. Помістити в суміш рівних об'ємів калію залізохлоридистого і соляної кислоти на 15-20 хв. Хімічний стакан з цією сумішшю помістити на водяну баню та нагріти до 50-56° С.
- 4. Промити проточною водою 10-15 хв.
- 5. Ополоснути дистильованою водою.
- 6. Дофарбувати мазки розчином сафраніну.

Література: Справочник по клиническим лабораторным методам исследования / Под ред. проф. Е.А.Кост.-М.: Медицина, 1975.-С.179-180.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ЦИТОХІМІЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ СУКЦИНАТДЕГІДРОГЕНАЗИ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Активність ферменту оцінюється по реакції відновлення солей гетразолію у вигляді осаду диформагану.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Хімічні стакани, ГОСТ 1770-74
2. Мірні циліндри місткістю 100, 1000 мл, ГОСТ 1770-74
3. Піпетки скляні градуйовані місткістю 1, 5, 10 мл, ГОСТ 20295-74
4. Мірні колби місткістю 100, 500 мл, ГОСТ 1770-74
5. Ділильні лійки ВД-1-100
6. Термостат ТС-80 М ТУ 64-1-1382-83
7. Терези електронні ВЛ Е-134, ГОСТ 24104-88
8. рН-метр-мілівольтметр, тип рН-150, ГОСТ 22261-82
9. Мікроскоп "Біолам" (Ломо, Росія)
10. Предметні скельця, ГОСТ 9289-59

РЕАКТИВИ

1. Ацетон, кваліфікація «чда», ГОСТ 2603-79
2. Сукцинат натрію, кваліфікація «ч», ГОСТ 5839-77
3. Натрій кислий вуглекислий, кваліфікація «ч», ГОСТ 4201-66
4. Хлорид кальцію, кваліфікація "ч", ТУ 6-09-4711-81
5. Хлорид алюмінію, кваліфікація «чда», ГОСТ 3759-75
6. Нітросиній тетразолій (НСТ), ТУ 6-09-07-1265-81
7. Міцний червоний, ("Chemapol", Чехія)

РОЗЧИНИ

1. 60% водний розчин ацетону.
2. Інкубаційне середовище: у мірний циліндр, місткістю 100 мл помістити 10 мл 0,2 М фосфатного буфера (рН 7,4), 10 мл 0,2 М розчину сукцината натрію, 2,0 мл 0,6 М розчину бікарбонату натрію, 0,2 мл 0,03 М розчину хлориду кальцію, 0,2 мл 0,03 М розчину хлориду алюмінію, а також 10 мг солі НСТ, розчиненого в 10 мл дистильованої води. Довести дистильованою водою до 40 мл.
3. 0,1% водний розчин міцного червоного: у мірну колбу, місткістю 100 мл помістити 0,1 г міцного червоного, зваженого на електронних терезах з точністю до 0,005 г, долити близько 50 мл дистильованої води. Ретельно перемішати. Долити водою до мітки. Зберігати в темному прохолодному місці.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. Приготовані ex tempore сухі мазки, фіксувати в 60% ацетоні 30-60 сек.
2. Промити в дистильованій воді і висушити на повітрі.
3. Інкубувати в інкубаційному середовищі 60 хв. при температурі +37°C у термостаті.
4. Промити дистильованою водою.
5. Дофарбувати розчином міцного червоного 10 хв. Активність ферменту виявляється у вигляді синіх гранул.

Активність ферменту локалізується в мітохондріях (нейтрофіли, лімфоцити, тромбоцити, гранулоцити, мегакаріоцити, еритро- і нормобласти).

Література: Nachlas M.M. et al. Cytochemical Demonstration of Succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitro phenyl substituted Ditetrazole. J. Histochem. - 1957. - Vol.5. - P.420-436.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ЦИТОХІМІЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ДНК

ПРИНЦИП МЕТОДУ ФЕЛЬГЕНА.

Дезоксирибоза, яка входить в склад ДНК, при гідролізі перетворюється в нуклеїд, який дає червоно-фіолетове забарвлення з реактивом Шиффа.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

Хімічні стакани, місткістю 50 мл, ГОСТ 1770-74
Мірні циліндри, місткістю 100, 1000 мл ГОСТ 1770-74
Піпетки скляні градузовані, місткістю 1, 5, 10 мл, ГОСТ 20295-74
Мірні колби, місткістю 100, 250, 500 мл, ГОСТ 1770-74
Термостат ТС-80 М ТУ 64-1-1382-83

РЕАКТИВИ

Фуксин лужний, кваліфікація «ч», ТУ МХП 2757-51
Метабісульфіт калію, кваліфікація «фарм», («Merck», Україна, Київ)
Соляна кислота концентрована, кваліфікація «ч» ГОСТ 3118-77
Карболол (активоване вугілля), (ЗАТ НВЦ «Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод», Україна)
Хлороформ, кваліфікація «ч», ТУ 6-09-06-800-76
Льодяна оцтова кислота, кваліфікація «хч», ГОСТ 6175
Спирт етиловий 96°, ГОСТ 5962-67
Світловий зелений (ліхтгрюн), («Chemapol», Чехія)

РОЗЧИНИ

Реактив Шиффа: 1 г лужного фуксину розчинити в 200 мл киплячої дистильованої води. По мірі охолодження в розчин додати 1 г метабісульфіту калію і 20 мл 1 н соляної кислоти. Залишити на 1 добу. Додати 1 таблетку карбололу (подрібненого) і залишити на добу. Профільтрувати. Зберігати в темному місці на холоді, щільно закритим. Легке почервоніння розчину свідчить про його непридатність.

1 н розчин соляної кислоти: 82,5 мл соляної кислоти питомої ваги 1,19 розвести дистильованою водою до 1 л.

Сірчиста вода: до 10 мл 10% розчину метабісульфіту калію додати 10 мл дистильованої води і 10 мл 1 н розчину соляної кислоти. Готувати за стандартним методом використанням.

- 0,1% спиртовий розчин світлового зеленого.
- Рідина Карнуа: до шести частин етилового спирту 96° додати три частини хлороформу та одну частину концентрованої оцтової кислоти. Перемішати.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

- Препарат фіксувати в рідині Карнуа 6-10 хв.
 - Ополоснути в дистильованій воді 2 хв.
 - Ополоснути в розчині 1 н соляної кислоти холодної, потім провести тією ж в соляній кислоті при температурі +60°С 4-15 хв. (оптимально 8-12 хв.)
 - Промити в дистильованій воді.
 - Фарбувати реактивом Шиффа 60 хв.
 - Промити в 3-х змінах сірчистої води по 3 хв.
 - Промити в 3-х змінах дистильованої води по 3 хв.
 - Дофарбувати розчином світловим зеленим.
 - Промити в дистильованій воді.
- ДНК забарвлюється в фіолетовий колір на зеленому фоні.

Література: Лецкий В.Б. Цитохимические исследования лейкоцитов (методическое письмо). - Ленинград, 1970. - с.30;

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ЦИТОХІМІЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ГЛІКОГЕНУ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Під впливом періодату калію глікольні гранули глікогену окислюються утворюючи альдегіди, що реагують з реактивом Шиффа. Продукти реакції забарвлюються у вишнево-червоний колір.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

- Хімічні стакани, місткістю 50 мл, ГОСТ 1770-74
- Мірні циліндри, місткістю 100, 1000 мл, ГОСТ 1770-74
- Піпетки градуйовані скляні, місткістю 1, 5, 10 мл, ГОСТ 20295-74
- Лійки скляні, ГОСТ 1770-74
- Мірні колби, місткістю 100, 250, 500 мл, ГОСТ 1770-74
- Термостат ТС-80 М ТУ 64-1-1382-83
- Газові пальники
- Терези електронні ВЛЕ - 134, ГОСТ 104-88
- Мікроскоп "Біолам" (Ломо, Росія)
- Предметні скельця, ГОСТ 9289-59

РЕАКТИВИ

- Періодат натрію, кваліфікація «чда», 21448
- Лужний фуксин, кваліфікація «ч», ТУ МХП 2757-51

1. Метабісульфіт калію ("Merck", Україна, Київ)
2. Соляна кислота концентрована, кваліфікація «ч» ГОСТ 3118-77
3. Карболен (активоване вугілля), (ЗАТ НВЦ "Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод", Україна)
4. Спирт етиловий 96°, ГОСТ 5962-67
5. Міді нітрат, кваліфікація "pura" (Poland)
6. Кальцій азотнокислий чотирьохводний, ГОСТ 4142-77
7. Формалін ТУ 6-09-3011
- III. Світловий зелений (ліхтгрюн) ("Chemapol", Чехія)

РОЗЧИНИ

1. 0,03 М розчин періодату натрію: 230 мг періодату натрію, зваженого на електронних терезах з точністю 0,005 розчинити в 100 мл дистильованої води, готувати перед використанням.
2. Реактив Шиффа: 1 г лужного фуксину розчинити в 200 мл кип'ячої дистильованої води. По мірі охолодження в розчин додати 1 г метабісульфіту калію і 20 мл 1 н соляної кислоти. Залишити на 1 добу. Додати 1 таблетку карболену (подрібненого) і залишити на добу. Фільтрувати. Зберігати в темноті, на холоді, щільно закритим. Зберігати декілька місяців. Ночервоніння (легке) свідчить про непридатність реактиву.
3. Сірчиста вода: до 10 мл 10% розчину метабісульфіта калію додати 200 мл дистильованої води і 10 мл 1 н розчину соляної кислоти. Готувати перед використанням.
4. Реактив Шабадаша: до 100 мл етилового спирту додати 1,8 г міді нітрату, 0,9 г кальцію нітрату і 10 мл формаліну.
5. 1 н розчин соляної кислоти: 82,5 мл соляної кислоти питомої ваги 1,19 доводять дистильованою водою до 1 л.
6. 0,1% спиртовий розчин світлового зеленого. 0,1 г фарби, зваженої на електронних терезах з точністю до 0,005 г, перенести в мірну колбу, місткістю 100 мл, додати приблизно 95 мл дистильованої води, ретельно перемішати до повного розчинення фарби, довести водою до мітки. Зберігати в темному місці.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. Приготувати препарат, зафіксувати в реактиві Шабадашу на протязі 30 хв. відразу після приготування.
2. Промити в дистильованій воді двічі.
3. Занурити в розчин періодату на 20 хв. в темному місці.
4. Промити в дистильованій воді тричі.
5. Ополоснути в сірчистій воді 1-2 хв.
6. Фарбувати реактивом Шиффа 30-40 хв. в темному місці.
7. Промити в 3 змінах сірчистої води по 3 хв.

8. Промити в 3 змінах дистильованої води по 3 хв.

9. Фарбувати світловим зеленим 10-20 хв.

10. Промити в дистильованій воді.

Глікоген забарвлюється в вишнево-фіолетовий колір на зеленому фоні препарату.

Глікоген легко віддиференціювати пробою зі слиною.

Препарат помістити в свіже зібрану слину і залишати на 30 хв. в термостаті.

Потім провести фарбування для визначення глікогену.

При фарбуванні враховувати:

а) +++ - різко позитивна реакція

б) ++ - позитивна реакція

в) + - слабо позитивна реакція

г) -- негативна реакція

Розрахунок проводити на 100 клітин.

Середній цитохімічний коефіцієнт = $(ax3)+(bx2)+(vx1)+(gx0)/100$

Література: Шабдаш А.Л. Рациональная методика гистохимического обнаружения гликогена и ее теоретические обоснования / Известия АН СССР серия биологическая. - 1947. - Вып. 6. - С. 745-760.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ЦИТОХІМІЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЛІПІДІВ СУДАНОМ III

ПРИНЦИП МЕТОДУ

За методом Гольдмана судан III в присутності альфа-нафтолу фарбує нейтральні жири в червоний колір.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Хімічні стакани місткістю 50 мл, ГОСТ 1770-74
2. Мірні циліндри місткістю 100, 1000 мл, ГОСТ 1770-74
3. Піпетки скляні градуйовані місткістю 5, 10 мл, ГОСТ 20295-74
4. Лійки скляні, ГОСТ 1770-74
5. Мірні колби місткістю 100, 250, 500 мл, ГОСТ 1770-74
6. Термостат ТС-80 М ТУ 64-1-1382-83
7. Газовий пальник
8. Предметні скельця, ГОСТ 9289-59
9. Плита електрична з зак сп., тип ЕПШ-1-0,8, ГОСТ 14919-83

РЕАКТИВИ

1. Судан III, кваліфікація "ч", ("Реагент", Рига)
2. Спирт етиловий 96°, ГОСТ 5962-67
3. Альфа-нафтол кваліфікація "чда", ГОСТ 5838-51

1. Формалін, ТУ 6-09-3011

1. Барвник Романовського-Гімзи, ТУ 6-09-07-1463-85

РОЗЧИНИ

1. Розчин судану: до 100 мл 70 % етилового спирту додати 20 мл дистильованої води, 1,2 г альфа-нафтолу і в надлишку судан III. Розчин витримати 10 хв і профільтрувати.

2. Формаліновий спирт: 1 частину формаліну змішати з 4 частинами 96° етилового спирту.

3. 70% етиловий спирт: до 100 мл 96° етилового спирту додати 39,18 мл дистильованої води.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. Мазки крові фіксувати в формаліновому спирті 1-3 хв.

2. Фарбувати в розчині судану III 10 хв.

3. Помістити в 70% спирт на 1 хв.

4. Дофарбовувати барвником Романовського-Гімзи 5-10 хв.

Ліпіди виявляються у вигляді жовтогарячих зерен.

Література: Дозорцева Г.Л. Функциональная диагностика в акушерстве и гинекологии на основе цитологического исследования.- Минск, 1952.- С.37-39.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ЦИТОХІМІЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЛІПІДІВ СУДАНОМ ЧОРНИМ В

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Застосовується барвник судан чорний В, який розчинний в жирах, при наємодії забарвлює останні у чорний колір.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Хімічні стакани місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74
2. Мірні циліндри місткістю 50, 100 мл ГОСТ 1770-74
3. Лійки скляні, ГОСТ 1770-74
4. Мірні колби місткістю 100, 250, 500 мл, ГОСТ 1770-74
5. Термостат ТС-80 М, ТУ 64-1-1382-83
6. Сухожарова шафа СЕШ-3М, ТУ-25.02.210718-78
7. Терези електронні ВЛ Е-134, ГОСТ 24104-88

РЕАКТИВИ

1. Судан чорний В, ГОСТ 3116-51
2. Спирт етиловий 96°, ГОСТ 5962-67

3. Формалін, ТУ 6-09-3011
4. Карболова кислота, кваліфікація "чда" ("Лакема", Чехія)
5. Натрію фосфат двозаміщений, кваліфікація «чда», ТУ 64-64-72
6. Барвник Романовського-Гімзи, ТУ 6-09-07-1463-85
7. Мідь сірчанокисла п'ятиводна, кваліфікація "чда", ГОСТ 897-68

РОЗЧИНИ

1. 100% спирт: сірчанокислої міді прожарити у сухожаровій шафі (до блідосинього кольору), насипати у чисту скляну пляшку з притертою пробкою, налити 96° спирт (приблизно 10 г сірчанокислої міді на 100 мл спирту). Потім пляшку струшувати до рівномірного розподілу порошку. Подібну процедуру повторити на протязі 1-2 діб. По мірі поглинання порошок здобуває сине забарвлення. Спирт перелити у другу пляшку, яка містить свіжу порцію прожареної сірчанокислої міді. Подібну процедуру повторити до тих пір, поки осад не перестане здобувати голубий колір. Обезводнений спирт профільтрувати у чистий посуд, який щільно закрити.
2. Розчин судану чорного В: розчинити 0,3 г судану чорного В в 100 мл абсолютного спирту. Залишити при кімнатній температурі на 1-2 дні до повного розчинення.
3. Буферний розчин:
 - А. 16 г кристалічної чистої карболової кислоти розчинити в 30 мл абсолютного спирту;
 - Б. 0,3 г двозаміщеного фосфату натрію розчинити в 100 мл дистильованої води.
 Розчини А і Б змішати. Перед використанням приготувати забуферений розчин судану, змішуючи 60 мл розчину судану і 40 мл буферного розчину.
4. Барвник Романовського-Гімзи: 2 краплі на 1 мл дистильованої води.
5. Спирт 70%: до 100 мл 96° спирту додати 39,18 мл дистильованої води.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. Мазки зафіксувати в парах формаліну 10 хв.
2. Занурити в буферний розчин судану на 30 хв в термостаті при 37° С.
3. Промити в 70% розчині етилового спирту.
4. Фарбувати барвником Романовського-Гімзи 30 хв.

КЛІНІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ

В мазках периферійної крові ліпіди містяться в цитоплазмі нейтрофілів у вигляді значної зернистості.

Середній цитохімічний коефіцієнт ліпідів в нейтрофілах - $2,65 \pm 0,31$. Підвищення вмісту ліпідів в нейтрофілах спостерігається при гострих лейкозах і загостренні хронічних лейкозів.

Література: 1. Основы гистологии с гистологической техникой / П. П. Покрова, Ю. К. Елецкий. - М.: Медицина, 1971. - С. 245. - 2. Справочник по цитохимическим лабораторным методам исследования / Под ред. проф. Е. А. Кост. - Медицина, 1975. - С. 170.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ЦИТОХІМІЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ПЕРОКСИДАЗИ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Цим методом Грехема-Кнолля, в присутності пероксидази бензидин окислюється перекисом водню в коричневий продукт реакції - оксибензидин.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

- Хімічні стакани, місткістю 50 мл, ГОСТ 1770-74
- Мірні циліндри, місткістю 50, 100 мл, ГОСТ 1770-74
- Шпетки скляні градуйовані, місткістю ГОСТ 20295-74
- Предметні скельця, ГОСТ 9289-59
- Секундомір тип СОС пр. -26-2-000, ТУ23-1894.003-90

РЕАКТИВИ

- Спирт етиловий 96°, ГОСТ 5962-67
- Формалін ТУ 6-09-3011
- Бензидин («Chemapol», Чехія)
- Перекис водню, ГОСТ 10929-76
- Барвник Романовського-Гімзи ТУ6-09-07-1463-85

РОЗЧИНИ

- 4% формаліно-спиртовий розчин: змішати 10 частин формаліну і 90 частин 96° спирту.
- Пероксидазний реактив: бензидин (на кінчику ножа) розчинити в 6 мл 96° спирту, додати 4 мл дистильованої води і 0,02 мл 3% перекису водню. Придатний для використання протягом 5-6 діб.
- Барвник Романовського-Гімзи або метиленовий синій.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

- Свіжі мазки зафіксувати в 4% формалін-спиртовому розчині 30 сек.
- Промити в проточній воді та висушити.
- Залити пероксидазним реактивом на 5 хв.
- Промити в проточній воді і висушити. Пероксидаза виявляється у вигляді коричневих гранул.

Література: Тодоров И. Клинические и лабораторные исследования в педиатрии. - София, 1963. - 468 с.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ЦИТОХІМІЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ КИСЛОЇ ФОСФАТАЗИ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Розщеплення кислою фосфатазою (К.Ф. 3.1.3.2) альфа-нафтіл[...]
в кислому середовищі (рН 5,2) призводить до вивільнення альфа-...
який з солями діазонію утворює нерозчинний осад коричневого колору
ділянках локалізації ферменту.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Хімічні стакани, ГОСТ 1770-74
2. Мірні циліндри, місткістю 100, 1000мл, ГОСТ 1770-74
3. Піпетки скляні градуйовані, місткістю 1, 5, 10 мл, ГОСТ 20295-74
4. Мірні колби, місткістю 100, 500 мл, ГОСТ 1770-74
5. Термостат ТС-80 М ТУ 64-1-1382-83
6. Терези електронні ВЛЕ-134, ГОСТ 24104-88
7. рН-метр-мілівольтметр, тип рН-150, ГОСТ 22261-82
8. Мікроскоп "Біолам" (Ломо, Росія)
9. Предметні скельця, ГОСТ 9289-59
10. Холодильник побутовий ТУ 84-89

РЕАКТИВИ

1. Лимонна кислота, кваліфікація «чда», ГОСТ 3652-69
2. Натрію цитрат зневоднений, кваліфікація "чда", ГОСТ 22280-76
3. Хлорид магнію, кваліфікація «чда», ГОСТ 4209-77
4. Нафтол-AS-фосфат (нафтол-AS-TR-фосфат, нафтол-AS-ВІфосфат)
("Сметарол", Чехія)
5. Диметилформамід (мурашиної кислоти диметиламід), ГОСТ 20289-74
6. Стійкий синій ВВ ("Сметарол", Чехія)
7. Хлорид натрію, кваліфікація «чда», ТУ 6-09-5222-85

РОЗЧИНИ

1. 0,1 М цитратний буфер рН 5,2. Змішати 30,5 мл 0,1 М лимонної кислоти
(0,1 М розчин містить 21,01 г/л) та 69,5 мл 0,1 М натрію цитрату (0,1 М
розчин містить 29,41 г/л).
2. 0,05 М хлорид магнію. Наважку 1,02 г хлориду магнію розчинити в
дистильованій воді в мірній колбі, місткістю 100 мл. Перемішати.
3. Барвник Романовського-Гімзи. 1 мл розчинити у 9 мл дистильованої води
4. 0,15 М розчин хлориду натрію: наважку хлориду натрію масою 9 г, зважену
з точністю 0,005 г, розчинити в мірній колбі місткістю 1000 мл, перемішати

інкубаційне середовище. До 5 мл диметилформаміду, в якому розчинено 0,1 мг альфа-нафтол-AS-фосфату додати 15 мл 0,1 М цитратного буферу, 5 мл 0,1 М хлориду магнію, 50 мг стійкого синього ВВ та 45 мл дистильованої води. Перемішати. Профільтрувати. Готувати перед використанням.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

Мазки, висушені на повітрі препарати (нефіксовані!) інкубувати в інкубаторі 2 години при 37° С в інкубаційному середовищі.

Після інкубації препарати обережно промити у 0,15 М розчині хлориду кальцію.

Препарати висушити та дофарбувати 30 хв. барвником Романовського (якщо інколи краще дофарбовувати сафраніном). На 1 мл дистильованої води додати 2 краплі фарби.

Промити у проточній воді.

Активність ферменту виявляється у вигляді синього забарвлення.

Підсильні значення та клінічна оцінка. Активність ферменту виявляється в 10% зрілих гранулоцитів та в 6% лімфоцитів крові (відповідно середній гистохімічний коефіцієнт становить $0,386 \pm 0,028$ та $0,268 \pm 0,019$); у дітей активність вища. Підвищення активності відбувається при запаленні, туберкульозі, інфаркті міокарду, гострих хірургічних захворюваннях, злоякісних пухлинах. В лімфоцитах активність підвищується при хронічних захворюваннях, у реконвалесцентів, а також після імунізації.

Література: 1. Берстон М. Гистохимия ферментов.-М.: Мир, 1965.- С.215. – 2. Буйкис Ю.Ф., Буйкис И.М. Опыт гистохимического выявления кислой фосфатазы методом азосочетания в срезах почки и в мазках клеток периферической крови и головного мозга / Вопросы лейкологии.- Рига, 1969. - № 1. - С. 377-383.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ЦИТОХІМІЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЛУЖНОЇ ФОСФАТАЗИ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Розщеплення лужною фосфатазою (К.Ф. 3.1.3.1) альфа-нафтілфосфату з підвищенням альфа-нафтолу, який утворює з солями діазонію нерозчинний продукт реакції коричневого кольору в ділянках локалізації ферменту.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

Хімічні стакани, ГОСТ 1770-74

Мірні циліндри, місткістю 100, 1000мл, ГОСТ 1770-74

Піпетки скляні градуйовані, місткістю 1, 5, 10 мл, ГОСТ 20295-74

Мірні колби місткістю 100, 500 мл, ГОСТ 1770-74

5. Термостат ТС-80 М ТУ 64-1-1382-83
6. Терези електронні ВЛЕ-134, ГОСТ 24104-88
7. рН-метр-мілівольтметр, тип рН-150, ГОСТ 22261-82
8. Мікроскоп "Біолам" (Ломо, Росія)
9. Предметні скельця, ГОСТ 9289-59
10. Холодильник побутовий ТУ 84-89

РЕАКТИВИ

1. Спирт етиловий 96°, ГОСТ 5962-67
2. Формалін ТУ 6-09-3011
3. Трис (тригідроксиметиламінометан), кваліфікація «чда», ТУ 6-09-3011
4. Кислота соляна концентрована, кваліфікація «чда», ГОСТ 30118-77
5. Нафтол-AS-фосфат (нафтол-AS-TR-фосфат, нафтол-AS-Віпрофат) ("Chemapol", Чехія)
6. Сійкий синій RR ("Chemapol", Чехія)
7. Метиловий зелений, ГОСТ 5853-51

РОЗЧИНИ

1. 10% розчин формаліну в 96° етилового спирту. 10 мл формаліну додати до 90 мл 96° етилового спирту.
2. 0,08 М трис-буфер, рН 9,2-9,8. Наважку трису, масою 121 мг, зважену з точністю 0,005 г, внести в мірну колбу, місткістю 50 мл, розчинити в 10 мл дистильованої води, додати 1 мл 0,1 н розчину соляної кислоти. Перевірити рН. Довести об'єм до мітки.
3. 2% розчин метилового зеленого (очищення див. в методі Браун) наважку метилового зеленого масою 2 г, зважену з точністю 0,005 г, розчинити в 98 мл дистильованої води, перемішати.
4. Інкубаційне середовище. До 35 мг нафтол-AS-фосфату додати 35 мл сійкого синього RR та 35 мл 0,08 М трис-буферу. Перемішати. Перед застосуванням профільтрувати. Використовувати тільки свіжим!

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. Приготувати мазок, висушити його на повітрі та зафіксувати 30 сек 10% розчином формаліну при температурі 0- +4° С.
2. Висушити мазки на повітрі та нанести на них інкубаційне середовище. Термін реакції визначається дослідним шляхом, в залежності від якості реагентів може складати 10 хв. - 3 години.
3. Інкубаційне середовище злити, стекла ополоснути проточною водою 10 сек.
4. Стекла висушити та дофарбувати метиловим зеленим 25 хв. (15 хв. теплий період року). Ополоснути та висушити.

Примітка: забарвлений продукт реакції розчиняється в жирі. Необхідно бути обережними з імерсійною олією.

нормальні значення та клінічна оцінка: для чоловіків середній коефіцієнт - $0,21 \pm 0,007$ од.; для жінок середній цитохімічний коефіцієнт - $0,31 \pm 0,008$ од.

Підвищення активності властиве для хронічного мієлолейкозу. Підвищення активності також спостерігається при еритремії. Підвищення активності спостерігається також при різних процесах, інтоксикаціях, пухлинах, колагенозах, цирозі печінки. Фермент може бути використаний як диференціально-діагностична ознака при гемоїдних реакціях (активність ферменту підвищена) та хронічному лейкозі. Зниження активності часто супроводжує вірусний гепатит, цитохімічний мононуклеоз, променеву хворобу. В клітинах крові активність ферменту фосфатази знайдена переважно в цитоплазмі нейтрофілів.

У здорових людей 20% зрілих нейтрофілів мають слабо позитивну реакцію. Решта клітини ферменту не містять.

Література: 1. Шубич М.Г. Цитохимическое определение щелочной фосфатазы лейкоцитов //Лабораторное дело. - 1965. - № 1. - С.10-14. - 2. Kaplow H. A Histochemical Procedure for Localizing and Evaluating Leukocyte Alkaline Phosphatase Activity in Smears of Blood and Marrow//Blood.-1955.-Vol.10, N 10.- P.1021-1029.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ КИСЛИХ МУКОПОЛІСАХАРИДІВ ПРИНЦИП МЕТОДУ

Грунтується на утворенні хімічних зв'язків між кислотними групами кислих мукополісахаридів з діалізованим залізом.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Хімічні стакани, місткістю 50 мл, ГОСТ 1770-74
2. Піпетки скляні градуйовані, місткістю 5, 10 мл, ГОСТ 20295-74
3. Мірні колби, місткістю 250, 1000 мл, ГОСТ 1770-74
4. Діалізні трубки чи мішки

РЕАКТИВИ

1. Хлороформ, кваліфікація «ч», ТУ 6-09-06-800-76
2. Льодяна оцтова кислота, кваліфікація «хч», ГОСТ 6175
3. Спирт етиловий 96°, ГОСТ 5962-67
4. Залізо хлорне, кваліфікація «хч», ГОСТ 4147-74
5. Кислота соляна концентрована, кваліфікація «ч», ГОСТ 3118-77
6. Калій заліzosиньородистий, кваліфікація «хч», ГОСТ 4206-40
7. Сафранін ("Chemapol", Чехія)
8. Гліцерин, кваліфікація «хч», ГОСТ 6259-75

ХІД ВИКОНАННЯ

1. Залити біологічний матеріал рідиною Буена на 2-24 години (в залежності від величини шматочка матеріалу).
2. Помістити матеріал в 70–80% спирт (для видалення пікринової кислоти) який міняти 2-3 рази.

ФІКСАЦІЯ РІДИНОЮ КАРНУА

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Застосовується як для гістологічних досліджень (ядра), так і для багатьох гістохімічних досліджень (нуклеїнові кислоти, білки, полісахариди).

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Колби мірні місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74
2. Стакани хімічні місткістю 50, 100 мл, ГОСТ 1770-74
3. Циліндри мірні місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74

РЕАКТИВИ

1. Спирт етиловий 96°, ГОСТ 5962-67
2. Хлороформ, кваліфікація "ч" ТУ 6-09-06-800-76
3. Льодяна оцтова кислота, кваліфікація "хч" ГОСТ 61-75

РОЗЧИНИ

Рідина Карнуа: відміряти мірним циліндром 60 мл 96° спирту, 30 мл хлороформу, 10 мл льодяної оцтової кислоти, перемішати. Розчин готується перед використанням.

ХІД ВИКОНАННЯ

1. Шматочки біологічного матеріалу товщиною до 5 мм залити рідиною Карнуа на 1-5 годин (в залежності від товщини матеріалу).
2. Ополоснути матеріал 2-3 рази в 96° спирті (у випадку необхідності можна залишити на 2-3 години).

ФІКСАЦІЯ ФОРМАЛІНОМ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Фіксатор швидко проникає в тканини, що дозволяє фіксувати шматочки органу від 1 см і більше, а при необхідності цілі органи. Здійснює тривалу фіксуючу дію, зберігає форму і структуру матеріалу, що досліджується, добре зберігає жири та ліпоїди.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

- 1. Циліндри мірні місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74
- 2. Стакани мірні місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74
- 3. Стакани хімічні місткістю 50, 100 мл, ГОСТ 1770-74

РЕАКТИВИ

- 1. Формалін, ТУ 6-09-3011
- 2. Кальцій вуглекислий, кваліфікація "хч" ГОСТ 5962-67

РОЗЧИНИ

- 1. 10% розчин формаліну (нейтральний): 1 частину формаліну розвести 9 частинами водопровідної води. Перед фіксацією необхідно провести нейтралізацію формаліну: вуглекислий кальцій засипати у посуд з формаліном в такій кількості, щоб на дні утворився шар товщиною 1,5-2 см. Формалін декілька разів енергійно збовтати і залишити на 24-48 год. Термін зберігання розчину необмежений.

ХІД ВИКОНАННЯ

- 1. Біологічний матеріал товщиною від 1 см і більше залити 10% розчином нейтрального формаліну на 24-48 годин і довше.
- 2. Після фіксації матеріал промити у проточній водопровідній воді 20-24 години.

Примітка: кількість фіксуючої рідини повинна перевищувати у 20 разів об'єм дослідного матеріалу. Фіксуючий матеріал необхідно помістити так, щоб забезпечити одночасно його просочування з усіх боків (покласти на марлю ватну, поміщену на дно посуду, або підвісити, загорнувши у марлю та прошити нитками). Рідина Буена та 10% розчин нейтрального формаліну придатні для тривалого зберігання матеріалу. Фіксація у рідині Карнуа при тривалому зберіганні матеріалу посилює його стиснення та ущільнення.

Література: Волкова О.В., Елещкий Ю.К. Основы гистологии с гистологической техникой. – М.: Медицина, 1971. - С. 205-207.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ЗАЛИВКИ БІОЛОГІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ В ПАРАФІН

ПРИНЦИП МЕТОДУ

В результаті проводки біологічних матеріалів тканина звільняється від надлишків фіксатору, обезводнюється, насичується і заливається парафіном.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

- 1. Циліндри мірні місткістю 250 мл, ГОСТ 1770-74
- 2. Стакани хімічні місткістю 1000 мл, ГОСТ 1770-74

3. Термостат ТС-80М-2, ГОСТ ТУ 64-1-1382-83
4. Плита електрична ЕПСІ-1-08/220, ГОСТ 14919-89
5. Бавовняні білі нитки
6. Бинт марлевий медичний, ГОСТ 1172-93
7. Спиртівка

РЕАКТИВИ

1. Спирт етиловий 96°, ГОСТ 5962-67
2. Хлороформ, кваліфікація "кч" ТУ 6-09-06-800-76
3. Парафін, ТУ 6-09-3637-89 (для лабораторних завдань)
4. Бджолиний віск.

РОЗЧИНИ

1. 70% спирт: відміряти мірним циліндром 73 мл 96° спирту та 27 мл дистильованої води, перемішати. Термін зберігання необмежений.
2. Суміш хлороформу і парафіну: змішати хлороформ та парафін у співвідношенні 1:1. Термін зберігання необмежений.
3. Суміш парафіну та воску: змішати 98 г парафіну та 2 г бджолиного воску. Розтопити та перемішати. Термін зберігання необмежений.

ХІД ВИКОНАННЯ

1. Промивання проточною водою: взяти біологічний матеріал, замотати марлю, забезпечену етикетками з відповідним номером, підвісити за шпатель в посуд, наповнений водопровідною водою. Середній час промивання 20-24 год. Таким чином видаляється з тканини надлишок фіксатору.
2. Обезводнювання: починаючи з цього моменту необхідно дотримуватися правила поступового впливу розчинів, що застосовуються, на дослідний матеріал. Для проведення процедури треба приготувати необхідну кількість посудин з кришками та етикетками відповідно для розчинів: 70% спирту (1 посудина), 96° спирту (3 посудини). Далі взяти біологічний матеріал, змочити, просушити та перенести в перший посуд з 70% спиртом. Зареєструвати час і залишити на добу. Далі необхідно дотримувати наступну схему:

70% спирт (II) - 1 доба

96° спирт (I) - 8 годин

96° спирт (II) - на ніч

96° спирт (III) - на дві години.

3. Насичення і заливка в парафін:

а) для видалення спирту з тканин краще використовувати хлороформ.

Обезводнені шматочки тканин перекласти в хлороформ на 2 год. В процесі видалення спирту хлороформ необхідно міняти 2 рази на протязі 4 год:

хлороформ I - 2 год.

хлороформ II - 2 год.

Водотримуючись принципів поступового заміщення хлороформу парафіном помістити дослідний матеріал в суміш хлороформу і парафіну та поставити в термостат при 37°C на протязі 3-6 год (при 56°C час скоротити до 30 хв - 1 години). При необхідності призупинити подальшу обробку матеріалу, посуд з органами вийняти з термостату і залишити висихати при кімнатній температурі (максимум 3 дня). Тривале перебування органу в цій суміші погіршує якість приготування зрізів. З метою повного звільнення органів від хлороформу матеріал провести послідовно через 2 порції розтопленого парафіну, в кожній порції по 2 години. Якщо орган добре обезводнений і не містить спирту, затримка в парафіні не погіршує якість дослідного матеріалу.

ІІ Заливка в суміш парафіну та воску: дослідний матеріал після кінцевого обезводнення необхідно залити сумішшю парафіну та воску. В якості формочок використати коробочки з цупкого паперу. Заливку здійснювати наступним чином: підготовану суміш підігріти до 58-60°C, акуратно занести в підготовану формочку. Потім підігріти дослідний матеріал на спиртівці і швидко перенести тканину в формочку з парафіном. Після цього формочку охолодити водою. Всі коробочки повинні бути промарковані. Таким чином, процес заливки може бути представлений наступною схемою:

I Промивання в проточній воді (24 год.).

II Проводка:

- 70% спирт (I) – 1 доба
- 70% спирт (II) - 1 доба
- 96° спирт (I) - 8 годин
- 96° спирт (II) - на ніч
- 96° спирт (III) – на дві години.
- хлороформ I - 2 год.
- хлороформ II - 2 год.
- хлороформ, парафін (1:1) - на ніч
- парафін I - 2 год.
- парафін II - 2 год.
- заливка в суміш парафіну та воску.

При маркеруванні шматочків біологічного матеріалу використовувати тільки простий графітний олівець. На цьому етап обезводнювання скінчується.

Примітка: тривале перебування матеріалу в спиртах пересушує його і негативно відображається на подальшій обробці матеріалу. Необхідно своєчасно міняти розчини спиртів, хлороформи та парафіни.

Література: Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии с гистологической техникой. – М.: Медицина, 1971. - С. 205-207.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ФАРБУВАННЯ ГІСТОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ ЗА МЕТОДОМ БРАУНА

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Деякі лужні фарбники вибірково приєднуються до нуклеїнових основ (при даному методі - піронін до РНК і метиловий зелений до ДНК). Ядерцець і цитоплазма набувають яскраво-червоного кольору, хромосоми ядер - зеленого або синьо-зеленого.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Циліндри місткістю 25, 50, 1000 мл, ГОСТ 1770-74
2. Колба мірна місткістю 250, 1000 мл, ГОСТ 1770-74
3. Піпетки скляні градуйовані місткістю 1, 5 мл, 2-й клас, ГОСТ 2000-1979
4. Стакани хімічні місткістю 50 мл, ГОСТ 1770-74
5. Покривні скельця 18x18, ГОСТ 6672-75
6. Терези електронні ВЛ Е-134, ГОСТ 24104-88
7. Секундомір тип СОС пр. - 26-2-000, ТУ 23-1894.003-90
8. Мікроскоп біокулярний Биолам Р II, (Ломо, Росія)
9. Папір фільтрувальний, ГОСТ 12026-76
10. Скло предметне, ГОСТ 9289-59
11. рН-метр-мілівольтметр, тип рН 150, ГОСТ 22261-8-82

РЕАКТИВИ

1. Піронін Б(В), кваліфікація "чда" ТУ 6-09-2047-79
2. Метиловий зелений, кваліфікація "чда" ГОСТ 5853-51
3. Льодяна оцтова кислота, кваліфікація "хч" ГОСТ 61-75
4. Натрій оцтовокислий, кваліфікація "ч" ТУ 6-09-246-84
5. Канадський бальзам, ("SIGMA", США)
6. Ксилол, кваліфікація "ч" ТУ 6-09-3854-75
7. Ацетон, кваліфікація "чда" ГОСТ 2603-79
8. Хлороформ, кваліфікація "хч" ТУ 6-09-06-800-76
9. Спирт етиловий 96°, ГОСТ 5962-67

РОЗЧИНИ

1. 5% розчин піроніну: наважку піроніну масою 5 г, взяту з точністю 0,001 г, розчинити в 95 мл дистильованої води, перемішати.
2. 2% розчин метилового зеленого: наважку метилового зеленого масою 2 г, взяту з точністю 0,005 г, розчинити в 98 мл дистильованої води, перемішати.
3. 0,5 М розчин льодяної оцтової кислоти: відміряти мірним циліндром 30 мл льодяної оцтової кислоти у мірну колбу місткістю 1000 мл, розчинити в дистильованій воді, довести об'єм до мітки, перемішати.

0,001 М розчин натрію оцтовокислого: наважку натрію оцтовокислого 68 г, взяту з точністю 0,005 г, кількісно перенести у мірну колбу об'ємом 1000 мл, розчинити в дистильованій воді, довести об'єм розчину до мітки, перемішати.

0,1 М ацетон у ксилолі: відміряти мірним циліндром 10 мл ацетону та 90 мл ксилолу, перемішати.

10% спирт: відміряти мірним циліндром 73 мл 96° спирту та 27 мл дистильованої води, перемішати.

40% спирт: відміряти мірним циліндром 42 мл 96° спирту та 58 мл дистильованої води, перемішати.

Розчин А: відміряти мірним циліндром 17,5 мл 5% розчину піроніну, 10 мл розчину метилового зеленого та 250 мл дистильованої води. Перемішати.

Розчин Б (0,5 М ацетатний буфер рН 4,8): відміряти мірним циліндром 120 мл 0,5 М розчин льодяної оцтової кислоти і 120 мл 0,5 М оцтовокислового натрію.

Перевірити рН розчину.

Розчин В: перед використанням змішати рівні об'єми розчинів А і Б. Термін зберігання - не більше тижня.

ХІД ВИКОНАННЯ

1. Занурити препарати двічі у ксилол на 2 хв для видалення парафіну.

2. Почергово занурити препарати у 96° спирт, 70 % спирт, 40 % спирт на протязі 2 хв.

3. Промити препарати дистильованою водою 2 хв.

4. Помістити препарати в розчині В (від 10 хв до 20 годин).

5. Промити препарати в дистильованій воді протягом декількох секунд (збільшення терміну промивки призводить до вимивання піроніну).

6. Висушити препарати фільтрувальним папером.

7. Помістити препарати в ацетон на 2 хв.

8. Перенести препарати в суміш з рівних частин ацетону і ксилолу на 2 хв.

9. Помістити препарати в 10% розчин ацетону в ксилолі на 2 хв.

10. Помістити препарати для просвітлення в дві порції ксилолу по 2 хв.

11. Заключити зріз в бальзам: декілька крапель бальзаму нанести на предметне скельце біля зрізу, предметне скельце поставити біля крапель бальзаму під кутом 45° і, як тільки бальзам розтечеться по краю покривного скельця, його потихеньку опускати. При цьому повітря поступово витісняється і бальзам покриває препарат тонким рівномірним шаром. Препарат необхідно зберігати від пилу та світла.

Примітки:

1. Фіксатори можуть бути різні, краще використовувати рідину Карнуа або Ценкера. Заливка у парафін.

2. Перед роботою необхідно здійснити очищення матеріалу зеленого від домішок метилового фіолетового, що сприяє кращим результатам забарвлення. Для цього до водного розчину метилового зеленого додати хлороформ і, закривши посуд, енергійно встряхнути. Після того, як суміш відстоїться, в ній чітко видно два шари: верхній - водний розчин хлороформу і нижній фіолетовий - хлороформ забарвлений метиловим фіолетовим. Зливши водний розчин, додати знову хлороформ і повторити всю процедуру. Повторювати проводити до тих пір, поки хлороформ не буде забарвлений на фіолетовий колір. Очищений і висушений препарат може зберігатися тривалий час.

Література: Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии с историческими техникой. - М.: Медицина, 1971. - С. 244-245.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ФАРБУВАННЯ ГІСТОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ ГЕМАТОКСИЛІН-ЕОЗИНОМ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Метод дозволяє отримати загальну уяву про стан органів і тканин, які досліджуються, завдяки вдалому поєднанню барвників. В розчині гематоксилін володіє основними властивостями і добре виявляє структурні компоненти ядра. Еозин володіє кислотними властивостями і забарвлює цитоплазму клітин в рожевий колір.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Циліндри мірні місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74
2. Колба мірна місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74
3. Піпетки скляні градуйовані місткістю 1, 5 мл, 2-й клас, ГОСТ 20292-77
4. Стакани хімічні місткістю 50 мл, ГОСТ 1770-74
5. Покривні скельця 18x18, ГОСТ 6672-75
6. Терези електронні ВЛ Е-134, ГОСТ 24104-88
7. Секундомір тип СОС пр. - 26-2-000, ТУ 23-1894.
8. Мікроскоп бінокулярний Биолам Р ІІ, (Ломо, Росія)
9. Папір фільтрувальний, ГОСТ 12026-76
10. Скло предметне, ГОСТ 9289-59

РЕАКТИВИ

1. Гематоксилін, ("Sigma", США)
2. Еозин, кваліфікація "хч" ТУ 6-09-183-75
3. Ксилол, кваліфікація "ч" ТУ 6-09-3854-75

синій бальзам, ("Sigma", США)
спиртовий 96°, ГОСТ 5962-67

РОЗЧИНИ

Розчин еозину: наважку еозину масою 0,1 г, взяту з точністю
розчинити в 99,9 мл дистильованій воді, перемішати. Термін
зберігання не обмежений.

Спирт: відміряти мірним циліндром 73 мл 96° спирту та 27 мл
дистильованої води, перемішати.

Спирт: відміряти мірним циліндром 42 мл 96° спирту та 58 мл
дистильованої води, перемішати.

ХІД ВИКОНАННЯ

Покрити препарати двічі у ксилол на 2 хв. для видалення парафіну.

Потім занурити препарати у 96° спирт, 70% спирт, 40% спирт на
по 2 хв.

Промити препарати дистильованою водою 2 хв.

Покласти препарати в горизонтальне положення і покрити зрізи
окисиліном на 5 – 10 хв. Промити дистильованою водою.

Препарати помістити в теплу водопровідну воду до того часу, поки не
вишлють ядра.

Виділити фільтрувальним папером залишки вологи навколо зрізу.

Покрити зрізи еозином на 10-15 хв.

Препарати ополоснути в 96° спирті два рази по 1-2 хв для
диференціювання. За ходом диференціювання стежити під мікроскопом.

Помістити препарати для просвітлення в дві порції ксилолу по 2 хв.

Заключити препарати в бальзам (див. стандартну методику фарбування
гістологічних препаратів за методом Браше).

Література: Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии с гистологической
микроскопией. – М.: Медицина, 1971. – С. 201-204.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ФАРБУВАННЯ ГІСТОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ ЗА МЕТОДОМ МАЛЛОРИ (модифікація)

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Чітко виявляє різноманітні елементи сполучної тканини, особливо
колагенові і ретикулінові волокна. Результат: колагенові і ретикулінові
волокна забарвлюються в темно-синій колір, слиз - синій колір, еритроцити
первоно-оранжевий, м'язові волокна - яскраво-оранжевий, хроматин -
червоний з жовтуватим відтінком, нейроглія і гангліозні клітини -

червонувато-фіолетові, секреторні гранули забарвлюються в червоний колір. У островках підшлункової залози гранули б-клітин забарвлюються в оранжево-червоний колір, гранули в-клітин - в блакитнувато-фіолетовий, а гранули кінцевих відділів підшлункової залози - в блакитнувато-фіолетовий. Іноді з оранжеватими зимогеновими гранулами.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Циліндри мірні місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74
2. Хімічні стакани місткістю 50 мл, ГОСТ 1770-74
3. Колба мірна місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74
4. Покривні скельця 18x18, ГОСТ 6672-75
5. Мікроскоп бінокулярний Биолам (Ломо, Росія)
6. Секундомір тип СОС пр. - 26-2- 000, ТУ 23-1894
7. Плита електрична з зак. сп. ЕПШ-1-08, ГОСТ 14919-836
8. Терези електронні ВЛ Е-134, ГОСТ 24104-88
9. Піпетки скляні градуйовані місткістю 1, 5 мл, 2-й клас, ГОСТ 20154-79
10. Папір фільтрувальний, ГОСТ 12026-76
11. Лійка скляна, А-2 ТУ 64-1-2828-81
12. Скло предметне, ГОСТ 9289-59

РЕАКТИВИ

1. Кислий фуксин, кваліфікація "ч" ТУ МХП 2757-51
2. Фосфорномолібденова кислота, кваліфікація "хч" ТУ МХП № 0101-26-55
3. Анілін водний, ГОСТ 5822-51
4. Оранжевий G, кваліфікація "чда" ТУ 6-09-4121-75
5. Щавелева кислота, кваліфікація "хч" ГОСТ 22180-76
6. Спирт етиловий 96°, ГОСТ 5962-67
7. Льодяна оцтова кислота, кваліфікація "хч" ГОСТ 61-75
8. Ксилол, кваліфікація "ч" ТУ 6-09-3854-75
9. Канадський бальзам, ("Sigma", США)
10. Гіпосульфит натрію, кваліфікація "чда" ГОСТ 4215-66
11. Йод, кваліфікація "чда" ТУ 6-09-25-45-72
12. Йодистий калій, кваліфікація "чда" ГОСТ 4232-74
13. Ртуті хлорид, кваліфікація "чда" ГОСТ 4519
14. Двохромовоокислий калій, кваліфікація "хч" ГОСТ 4220-75
15. Сірчаноокислий натрій, кваліфікація "чда" ГОСТ 4166-76
16. Аніліновий синій, кваліфікація "чда" ВТУ 887-53

РОЗЧИНИ

1. 40% спирт: відміряти мірним циліндром 42 мл 96° спирту та 58 мл дистильованої води, перемішати.

10. 96% спирт: відміряти мірним циліндром 73 мл 96° спирту та 27 мл дистильованої води, перемішати.
11. 94% спирт: відміряти мірним циліндром 94 мл 96° спирту та 4 мл дистильованої води, перемішати.
12. Розчин фосфорномолібденової кислоти: наважку фосфорномолібденової кислоти масою 1 г, взяту з точністю 0,005 г, розчинити в 99 мл дистильованої води, перемішати. Термін зберігання необмежений.
13. Розчин аніліну: відміряти скляною піпеткою 5 мл водного аніліну та додати з 95 мл дистильованої води. Розчин профільтрувати.
14. 2,5% розчин гіпосульфїту натрію: наважку гіпосульфїту натрію, масою 0,25 г, взяту з точністю 0,005 г, розчинити в 99,75 мл дистильованої води, перемішати. Термін зберігання необмежений.
15. Рідина Мюллера: наважки двохромовокислого калію масою 2,5 г та двохромовокислого натрію масою 1 г, взяті з точністю 0,005 г, розчинити в 100 мл дистильованої води, перемішати. Для кращого розчинення двохромовокислого калію рекомендується підігріти. Термін розчину необмежений.
16. Рідина Ценкера (сулемова суміш): наважку хлориду ртуті масою 5 г, взяту з точністю 0,005 г, розчинити у 100 мл рідини Мюллера, додати 5 мл концентрованої оцтової кислоти. Перемішати. Готується перед використанням.
17. Кислотний фуксин Альтмана: наважку кислотного фуксину масою 0,1 г, взяту з точністю 0,005 г, розчинити в 10 мл 5% водного розчину гіпосульфїту натрію. Перед використанням періодично розмішувати на протязі 24 години. Термін зберігання необмежений.
18. Барвна суміш: наважки анілінового синього масою 0,5 г, оранжевого масою 2 г, шавелевої кислоти масою 2 г, взяті з точністю 0,005 г, розчинити в 100 мл дистильованої води, перемішати. Суміш нагріти до кипіння, охолодити і профільтрувати. Суміш набуває інтенсивно червоний колір із зеленуватим відтінком. Після тривалого зберігання перед використанням розчин необхідно прокип'ятити і профільтрувати.
19. 70% розчин йодного спирту: до 100 мл 70% спирту додати приблизно 10 мл 90% спирту (який містить в 100 мл 90% спирту 2 г йоду і 3 г йодистого калію) до отримання кольору розчину міцного чаю.

ХІД ВИКОНАННЯ

1. Занурити препарати двічі у ксилол на 2 хв для видалення парафіну.
2. Почергово занурити препарати у 96° спирт, 70 % спирт, 40 % спирт на протязі 2 хв.
3. Промити препарати дистильованою водою 2 хв.
4. Перенести препарати в суміш Ценкера на 20 хв.
5. Промити препарати у дистильованій воді 2 хв.
6. Перенести препарати у 70% розчин йодного спирту на 10 хв.
7. Перенести препарати у 0,25% гіпосульфїту натрію на 5 хв.

8. Промити препарати дистильованою водою і перенести в розчин фуксин Альтмана на 1,5 хв.
9. Промити препарати у дистильованій воді 2 хв.
10. Для закріплення фарби препарати перенести у 1 % розчин ферромолібденової кислоти на 3 хв.
11. Промити препарати у дистильованій воді 1 хв.
12. Перенести препарати у барвну суміш на 20 хв. (унікаючи цитоплазму).
13. Промити препарати у дистильованій воді 2 хв.
14. Препарати ополоснути в 96° спирті два рази по 1-2 хв для диференціації. За ходом диференціювання стежити під мікроскопом.
15. Помістити препарати для просвітлення в дві порції ксилолу по 1 хв.
16. Заключити в бальзам (див. стандартну методичку фарбування гістологічних препаратів за методом Браше).

Література: Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологической и цитологической техники. – М.: Медицина, 1971. – С.213-214. Лилли Р. Патологическая техника и практическая гистохимия. – М.: Москва, 1969. – С. 268

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ФАРБУВАННЯ ЗА МЕТОДОМ ВАЛЛЯРТУ І УЕТТУ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Оснований на одночасному фарбуванні тканини барвниками, які забарвлюють ядра, цитоплазму, сполучну тканину в різні кольори. Результат фарбування: ядра - коричнево-чорні, цитоплазма - цегляно-червона, еритроцити - оранжево-жовті, сполучна тканина і слизові оболонки - фіолетові. Застосовується при фарбуванні зрізів залоз та при направленому шліфуванні сполучнотканинних структур.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Циліндри мірні місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74
2. Хімічні стакани місткістю 50 мл, ГОСТ 1770-74
3. Покривні скельця 18x18, ГОСТ 6672-75
4. Мікроскоп бінокулярний Биолам – РІІ (Ломо, Росія)
5. Секундомір тип СОС пр. – 26-2-000, ТУ 23-1894
6. Терези електронні ВЛ Е-134, ГОСТ 24104-88
7. Піпетки скляні градуйовані місткістю 1, 5 мл, 2-й клас, ГОСТ 20292-71
8. Папір фільтрувальний, ГОСТ 12026-76
9. Сухожарова шафа 2В-151 ТУ 64-1-1111-72
10. Скло предметне, ГОСТ 9289-59

РЕАКТИВИ

1. Спирт етиловий 96°, ГОСТ 5962-67
2. Ксилол, кваліфікація "ч" ТУ 6-09-3854-75

- ...ський бальзам, ("Sigma", США)
- ...гематоксилін, ("Sigma", США)
- ...ричте залізо, кваліфікація "ч" ГОСТ 4147-74
- ...важна кислота, кваліфікація "ч", ГОСТ 3118-77
- ...вий фуксин, кваліфікація "ч" ТУ МХП 2757-51
- ...фосфорномолібденова кислота, кваліфікація "хч" ТУ МХП N ОРУ-26-55
- ...ляна оцтова кислота, кваліфікація "хч" ГОСТ 61-75
- ...товий зелений, ("Loba-Chemia", Austria)
- ...ль сірчанокисла п'ятиводна, кваліфікація "чда", ГОСТ 897-68
- ...гематоксилін, реакім ("Reagent", Рига)

РОЗЧИНИ

- ...% спирт: відміряти мірним циліндром 73 мл 96° спирту та 27 мл дистильованої води, перемішати.
- ...40% спирт: відміряти мірним циліндром 42 мл 96° спирту та 58 мл дистильованої води, перемішати.
- ...100% спирт: сірчанокислої міді прожарити у сухожаровій шафі (до вищого кольору), насипати у чисту скляну пляшку з притертою пробкою, налити 96° спирт (приблизно 10 г сірчанокислої міді на 100 мл 96° спирту). Потім пляшку струшувати до рівномірного розподілу порошку. Подібну процедуру повторити на протязі 1-2 діб. По мірі поглинання води порошок здобуває сине забарвлення. Спирт перелити у другу пляшку, яка містить свіжу порцію прожареної сірчанокислої міді. Подібну процедуру повторити до тих пір, поки осад не перестане здобувати голубий колір. Незводнений спирт профільтрувати у чистий посуд, який щільно закрити.
- ...1% розчин кислого фуксину: наважку кислого фуксину масою 1 г, взяту з точністю 0,005 г, розчинити в 99 мл дистильованої води, перемішати. Термін зберігання необмежений.
- ...1% розчин льодяної оцтової кислоти: відміряти 1 мл льодяної оцтової кислоти змішати з 99 мл дистильованою водою. Термін зберігання необмежений.
- ...1% розчин фосфорномолібденової кислоти: наважку фосфорномолібденової кислоти масою 1 г, взяту з точністю 0,005 г, розчинити в 99 мл дистильованої води, перемішати. Термін зберігання необмежений.
- ...1% розчин світового зеленого: наважку світового зеленого масою 1 г, взяту з точністю 0,005 г, розчинити в 99 мл дистильованої води, перемішати. Термін зберігання необмежений.
- ...25% розчин соляної кислоти: відміряти мірним циліндром 25 мл соляної кислоти та змішати з 75 мл дистильованої води, перемішати.
- ...Залізний гематоксилін Вейгерта. Змішати порівну розчини А і Б. Термін зберігання 8 діб.

Розчин А: наважку гематоксиліну масою 1 г, взяту з точністю 0,005 г, розчинити в 100 мл 96° спирту, перемішати. Термін зберігання необмежений.

Розчин Б: наважку хлористого заліза 1,16 г, взяту з точністю 0,001 г розчинити у 98 мл дистильованої води та 1 мл 25% розчину соляної кислоти, перемішати.

Термін зберігання необмежений.

10. Барвна суміш: відміряти мірним циліндром по 10 мл 1% розчину еозину, 1% розчину фуксину, 1% розчину льодяної оцтової кислоти, 1% розчину ферромонолібденової кислоти, 1% розчину світового зеленого, перемішати.

ХІД ВИКОНАННЯ

1. Занурити препарати двічі у ксилол на 2 хв. для видалення парафіну.
2. Почергово занурити препарати у 96° спирт, 70 % спирт, 40 % спирт протязі 2 хв.
3. Промити препарати дистильованою водою 2 хв.
4. Перенести препарати у розчин залізного гематоксиліну Вейгерта на 2 хв.
5. Промити препарати в проточній воді до зникнення появи хмарок фарби.
6. Перенести препарати у барвну суміш на 5 хв.
7. Ополоснути препарати в дистильованій воді.
8. Перенести препарати в 1% розчин льодяної оцтової кислоти на 5 хв.
9. Перенести препарати для обезводнення в 96° спирт на 2 хв.
10. Помістити препарати для просвітлення у ксилол на 2 хв.
11. Заключити в бальзам (див. стандартну методику фарбування гістологічних препаратів за методом Браше).

Примітка: при цьому методі фарбування, цитоплазму, завдяки різкому кольору і контрасту з чорними ядрами, видно краще, ніж при фарбуванні іншими 3-х кольоровими методами. Цей метод вдало поєднується з фарбуванням по Маллорі і Гейденгайну.

Література: Лилли Р. Патологическая техника и практическая гистохимия – М.: Москва, 1969. – С. 268.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ФАРБУВАННЯ НЕРВОВОЇ ТКАНИНИ ПО ЕЙНАРСОНУ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Крім елективності забарвлення та легкості виконання, метод дає дуже стійкі препарати, зовсім не забарвлюються волокнисті структури. Метод виявляє такі зміни ядер як тигроліз, вакуолізація, аглютинація.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Циліндри мірні місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74
2. Хімічні стакани місткістю 50 мл, ГОСТ 1770-74
3. Покривні скельця 18x18, ГОСТ 6672-75
4. Мікроскоп бінокулярний Биолам Р-II, (Ломо, Росія)

- Грундомір тип СОС пр. – 26-2- 000, ТУ 23-1894
- Терми електронні ВЛ Е-134, ГОСТ 24104-88
- Папір фільтрувальний, ГОСТ 12026-76
- Скло предметне, ГОСТ 9289-59
- Панча електрична з зак. сп. ЕПШ-1-08/220
- рН – метр-мілівольметр, тип рН-1 50, ГОСТ 22261-8-82

РЕАКТИВИ

- Спирт етиловий 96°, ГОСТ 5962-67
- Ксилол, кваліфікація "ч" ТУ 6-09-3854-75
- Канадський бальзам, ("Sigma", США)
- Гематоксилін, ("Sigma", США)
- Галлоціанін, кваліфікація "ч" ТУ 6-09-2642-73
- Хромові галуни, кваліфікація "хч" ГОСТ 4162-71
- Кислота соляна концентрована, кваліфікація "ч", ГОСТ 3118-77

РОЗЧИНИ

70% спирт: відміряти мірним циліндром 73 мл 96° спирту та 27 мл дистильованої води, перемішати.

40% спирт: відміряти мірним циліндром 42 мл 96° спирту та 58 мл дистильованої води, перемішати.

5% розчин хромових галунів: наважку хромових галунів масою 5 г, взяту з точністю 0,005 г, розчинити в 95 мл дистильованої води, перемішати.

Розчин барвника: наважку 0,15 г галлоціаніну, взяту з точністю 0,005 г, розчинити в 100 мл 5% розчину хромових галунів, кип'ятити 3 хвилини при постійному перемішуванні. Після охолодження розчин профільтрувати та долити до 100 мл дистильованою водою. рН розчину повинен бути близько 2,09. Для великого мозку рН 1,95-2,59; для середнього, родовгватого та мозочка 2,68-2,73; для спинного мозку 2,73-3,25. рН треба доводити концентрованою соляною кислотою.

ХІД ВИКОНАННЯ

Занурити препарати двічі у ксилол на 2 хв для видалення парафіну.

Почергово занурити препарати у 96° спирт, 70% спирт, 40 % спирт на протязі 2 хв.

Промити препарати дистильованою водою 2 хв.

Препарати перенести у розчин барвника на 24-48 годин

Промити двічі препарати дистильованою водою по 5 хв

Перенести препарати для обезводнення в 96° спирт на 2 хв.

Помістити препарати для просвітлення у ксилол на 2 хв.

Заклучити препарати в бальзам (див. стандартну методику фарбування столігичних препаратів за методом Браше).

Примітка: фіксаторами тканин можуть бути спирт 96°, хлороформ, рідина Ценкера та інше).

Література: Ромейс Б. Микроскопическая техника: Изд-во Наследие литературы. – М.: Москва, 1953. – С. 411.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ФАРБУВАННЯ ГІСТОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ ЗА МЕТОДОМ ВАН ГІЗОНА ПРИНЦИП МЕТОДУ

Колагенові волокна сполучної тканини після забарвлення пікрининовою кислотою мають яскраво-червоний колір, а м'язові і еластичні волокна – буре-жовтий або жовто-зелений. Залізний гематоксилін Вейгерта забарвлює ядро в темно-коричневий або буро-чорний колір.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Циліндр мірний місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74
2. Колба мірна місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74
3. Піпетки скляні градуйовані місткістю 1 мл, 5 мл, ГОСТ 20292-74
4. Хімічні стакани місткістю 50 мл, ГОСТ 1770-74
5. Покривні скельця 18x18, ГОСТ 6672-75
6. Терези електронні ВЛ Е-134, ГОСТ 24104-88
7. Секундомір тип СОС пр. – 26-2-000, ТУ 23-1894
8. Мікроскоп біокулярний Биолам Р-ІІ (Ломо, Росія)

РЕАКТИВИ

1. Спирт етиловий 96°, ГОСТ 5962-67
2. Ксилол, кваліфікація “ч” ТУ 6-09-3854-75
3. Канадський бальзам, (“Sigma”, США)
4. Гематоксилін, (“Sigma”, США)
5. Залізоамонійні галуни, кваліфікація “ч” ГОСТ 4205-77
6. Кислота соляна концентрована кваліфікація “ч”, ГОСТ 3118-77
7. Кислота пікринова, кваліфікація “ч” ТУ 6-09-08-317-80
8. Кислий фуксин, кваліфікація “ч” ТУ МХП 2757-51

РОЗЧИНИ

1. 2% розчин залізоамонійних галунів: наважку залізоамонійних галунів масою 2 г, взяту з точністю 0,005 г, розчинити в 98 мл дистильованої води, перемішати.
2. 1% розчин кислого фуксину: наважку кислого фуксину масою 1 г, взяту з точністю 0,005 г, розчинити в 99 мл дистильованої води, перемішати.
3. Насичений розчин пікринової кислоти (готується попередньо за декілька

наважку пікринової кислоти масою 25-30 г, зважену з точністю 0,005 г, помістити у посуд і залити 1 л гарячої дистильованої води. Надлишок кислоти при подальшому випадає в осад і може бути використаний при приготуванні порції розчину. Термін зберігання розчину необмежений.

Гематоксилін Вейгерта: готувати змішуванням рівних об'ємів двох рівних розчинів.

Перший розчин: наважку гематоксиліну масою 1 г, взяту з точністю 0,005 г, розчинити в 100 мл 96° спирту, перемішати.

Другий розчин: 4 мл 2% розчину залізоамонійних галунів змішати з 1 мл пікринової кислоти, додати 95 мл дистильованої води, перемішати.

При змішуванні розчинів приливати другий розчин в перший в меншій кількості, потім його додавати по краплям з піпетки до рівної кількості з першим розчином. Забарвлення розчину має бути темно-фіолетовим. Розчин готується перед фарбуванням.

Розчин пікрофуксину: відміряти мірними циліндром 100 мл насиченого водного розчину пікринової кислоти, додати 5-10 мл 1% водного розчину водного фуксину, перемішати.

ХІД ВИКОНАННЯ

1. Занурити препарати двічі у ксилол на 2 хв для видалення парафіну.
2. По чергово занурити препарати у 96° спирт, 70 % спирт, 40 % спирт на протязі 2 хв.
3. Промити препарати дистильованою водою 2 хв.
4. У дистильованій воді препарати перенести в гематоксилін Вейгерта на 2-5 хв.
5. Ополоснути препарати в дистильованій воді і перенести в проточну воду на 10 хв (воду необхідно змінювати).
6. Помістити препарати на 1-3 хв. в розчин пікрофуксину.
7. Ополоснути препарати в дистильованій воді 5-10 сек.
8. Перенести препарати для обезводнення в 96° спирт на 2 хв.
9. Помістити препарати для просвітлення у ксилол на 2 хв.
10. Заключити в бальзам (див. стандартну методику фарбування гістологічних препаратів за методом Браше).

Примітка: необхідний постійний контроль під мікроскопом. Якщо ядра набувають бурого, а не чорного кольору, необхідно довше тримати зрізи в гематоксиліні або менше в пікрофуксині. Якщо волокна сполучної тканини забарвлюються в інтенсивно-червоний колір, треба зрізи після пікрофуксину подовше ополоснути в воді, якщо сполучна тканина блідо забарвлена фуксином, необхідно швидко ополоснути зрізи у воді або навіть не ополіскувати, а відразу перенести в спирт. Якщо отримуємо слабке забарвлення пікриновою кислотою (клітини залоз, гладкі м'язи), то

необхідно прискорити проводку зі спиртами. При переработці препарату пікриновою кислотою необхідно збільшити час перебування зрізів в спиртах.

Література: Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии и цитологии логической техникой. - М.: Медицина, 1971.- С.211-213.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ПРИГОТУВАННЯ ПРЕПАРАТІВ ДЛЯ ФЛЮОРОХРОМУВАННЯ ПРИНЦИП МЕТОДУ

Флюоресцентні барвники зв'язуються з компонентами кісткової тканини. Під впливом УФ-опромінення починають світитися.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Люмінесцентний мікроскоп ЛЮОММ-Р I, Т 33.854.007 N 1902
2. Покривні скельця 18x18, ГОСТ 6672-75
3. Секундомір тип СОС пр. - 26-2-000, ТУ 23-1894
4. Терези електронні ВЛ Е-134, ГОСТ 24104-88
5. Терези лабораторні ВЛР-200, 2-й клас, ГОСТ 19491-74
6. Папір фільтрувальний, ГОСТ 12026-76
7. Скло предметне, ГОСТ 9289-59
8. Термостат ТС-80М-2, ГОСТ ТУ 64-1-1382-83.
9. Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74
10. Хімічні стакани місткістю 50 мл, ГОСТ 1770-74
11. Колба мірна місткістю 1000 мл, ГОСТ 1770-74

РЕАКТИВИ

1. Хлорид натрію, кваліфікація "ч", ТУ 6-09-5222-85
2. Хлорид калію, кваліфікація "хч" ГОСТ 4234-77
3. Хлорид кальцію, кваліфікація "ч" ТУ 609-45-76
4. Гідрокарбонат натрія, кваліфікація "хч". ГОСТ 4201-79
5. Акридиновий оранжевий, кваліфікація "чда" реакім ("Реагент", Індія)
6. Конго-червоний, кваліфікація "чда", ГОСТ 5552-50
7. Кислий фуксин, кваліфікація "ч" ТУ МХП 2757-51
8. Глюкоза, кваліфікація "ч", ГОСТ 6038-51

РОЗЧИНИ

1. Розчин Рінгера-Локка: наважки хлориду натрію 9 г, хлориду калію 0,4 г, хлориду кальцію 0,24 г, гідрокарбонату натрію 0,1 г, глюкози 1 г, взяти з точністю 0,005 г, розчинити у 1000 мл дистильованої води, перемішати.
2. Розчин акридинового оранжевого (1:10 000): наважку акридинового

масою 0,001 г, зважену з точністю 0,0001 г, розчинити у 10 мл дистильованої води, перемішати.

Розчин конго червоного (1:10 000): наважку конго червоного масою 0,001 г, зважену з точністю 0,0001 г, розчинити у 10 мл дистильованої води, перемішати.

Розчин фуксини кислого (1:10 000): наважку фуксини кислого масою 0,001 г, зважену з точністю 0,0001 г, розчинити у 10 мл дистильованої води, перемішати.

Розчин основний розчин N 1 (флюорохром 1): змішати 0,2 мл розчину акрилового оранжевого (1:10 000), 0,4 мл розчину конго червоного (1:10 000), 2 мл розчину фуксини кислого (1:10 000) та 2 мл розчину Рінгера-Локка.

Розчин основний розчин N 2 (флюорохром 2): змішати 0,2 мл розчину оранжевого (1:10 000), 2 краплі розчину фуксини основного (1:10 000) та 2 мл розчину Рінгера-Локка. Готується перед використанням.

ХІД ВИКОНАННЯ

У пробірці розлити у віддільні пробірки по 0,4 мл.

У пробірки додати дослідну кров в об'ємі 0,1 мл. Контакт з флюорохромом не повинен перевищувати 50 хв. Суміш повинна зберегтись в темному місці при температурі 15-20° С.

Розчин суміші перенести на предметне скельце, покрити краплю кровним скельцем і продивитись препарат в УФ-світлі. Необхідно використовувати світлофільтри для ультрафіолетових променях (довжина хвилі 360 нм), УФС 6, товщиною 3,5 мм.

Примітка: для профілактики перегрівання фільтру використовувати моноглинаючий фільтр СЗС 24. «Запираючий» світлофільтр для УФС 40 "З-БС8.

Література: Иммунологические методы / Под ред. Г.Фримеля.- М.: Медицина, 1987. - 472 с.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ОЦІНКИ ДОВЖИНИ ОБ'ЄКТІВ НА ГІСТОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТАХ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Метод запропонований С.А.Салтиковим. Якщо на площу спостереження, містить декілька об'єктів, накласти випадкову лінію і підрахувати число перетинів об'єктів з лінією, то їх питому довжину можна визначити так:

$P \times R$

$$La = \frac{P \times R}{2 \times L}, \text{ де}$$

- питома довжина об'єкта на площині, Р - число перетинів об'єкту з лінією,
- довжина лінії, П - 3,1415926.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Мікроскоп біокулярний Биолам Р-II, (Ломо, Росія)
2. Окуляр з лінійкою
3. Реєстраційний журнал

ХІД ВИКОНАННЯ

1. Розташувати гістологічний препарат на столику мікроскопа, встановити різкість.
2. Вибрати поле зору і переміщати по ньому лінійку.
3. Підрахувати число перетинів об'єктів з лінійкою для кожного його положення.
4. Вибрати як мінімум 9 положень лінійки. Враховувати значення L для кожного положення лінійки, а потім знайти середнє арифметичне.

Література: Гуцол А.А., Кондратьєв Б.Ю. Практическая морфометрия органов и тканей: Для врачей патологоанатомов. - Томск: Изд-во Томск. ун-та, 1988. - 136 с.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ МОРФОМЕТРІЇ ОРГАНІВ І ТКАНИН (оцінка площі об'єктів)

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Метод лінійного інтегрування запропонований в 1898 р. А. Roswal. Якщо на площину спостереження, яка містить декілька об'єктів, накласти систему ліній, то відношення сумарної довжини відрізків ліній, що попали на площу об'єктів, до загальної довжини ліній рівне питомої площі об'єктів.

Основна формула:

$$\frac{l}{L} = \frac{S}{A}, \text{ або } lL = Sa,$$

де l - сумарна довжина ліній, що попали на об'єкт; L - загальна довжина ліній, Sa - питома площа.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

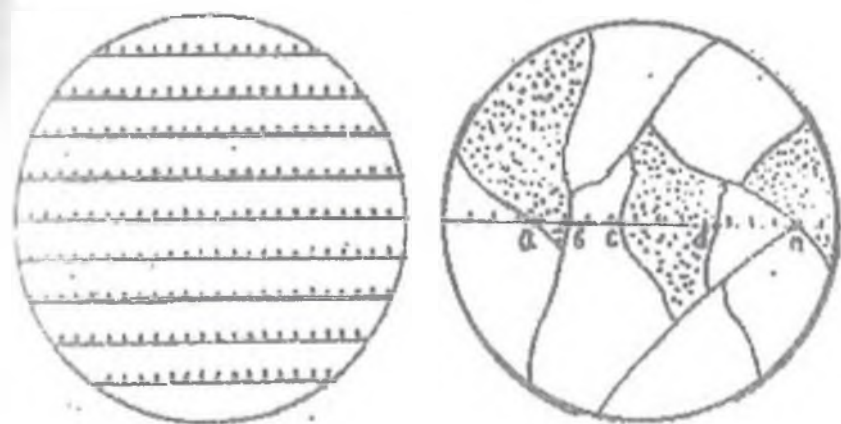
1. Мікроскоп біокулярний Биолам Р-II, (Ломо, Росія)
2. Окуляр з лінійкою
3. Реєстраційний журнал

ХІД ВИКОНАННЯ

1. Розташувати гістологічний препарат на столику мікроскопа, встановити різкість.

Виділити об'єкт дослідження. В процесі випромінювання не використовувати різкість (не користуватись мікровинтом!). Якщо в полі зору мікроскопу знаходиться декілька об'єктів різних типів, то при випадковому накладенні лінійки частина її довжини попадає на «пусту площу», а частина - на площу об'єктів. Для визначення питомої площі об'єкта потрібно скласти довжину хорд перетину (відрізки, що попали на площу об'єкта) і розділити цю суму на довжину лінійки. Необхідно пам'ятати за правило включати в хорду перетину товщину лінійки параметру.

Для кожної підрахунку необхідно розташовувати таким чином:



а) вид окуляру, що б) порядок розтошування використовується лінійки підрахунку

Для кожної структури врахувати власну величину. Наприклад, в кардіоміоцитах враховувати площу ядра і цитоплазми, в серці - площу кардіоміоцитів і жирової тканини. Як правило, враховують 9 вимірів:

$$\frac{17 + 18 + 15 + 16 + 15 + 16 + 17 + 18 + 19}{54 \quad 54 \quad 56 \quad 55 \quad 55 \quad 54 \quad 56 \quad 54 \quad 55}$$

$$Sa = \frac{\text{-----}}{9}$$

Література: Гуцол А.А., Кондратьев Б.Ю. Практическая морфометрия органов и тканей: Для врачей паталогоанатомов.- Томск: Изд-во Том. ун-та, 1988.- 136 с.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ПІДГОТОВКИ ТКАНИНИ ДЛЯ ЕЛЕКТРОННОМІКРОСКОПІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ

1. ЗАЛИВКА ТКАНИНИ У ВОДОНЕРОЗЧИМНУ ЕПОКСИДНУ СМОЛУ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Метод оснований на фіксуванні, відмиванні, зневодненні, прокрасці та заливанні матеріалу в епоксидну смолу.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Терези електронні ВЛ Е - 134, ГОСТ 24104-88
2. Секундомір тип СОС пр. – 26-2- 000, ТУ 23-1894. 003-90
3. Колби мірні місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74
4. Стакани хімічні місткістю 50, 100 мл, ГОСТ 1770-74
5. Циліндри мірні місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74
6. Термостат ТС-80М-2, ГОСТ 64-1- 1382-83
7. Фільтрувальний папір – ГОСТ 12026-76
8. Піпетки скляні градуйовані місткістю 1, 5, 10 мл, 2-й клас, ГОСТ 20199-77
9. Желатинні капсули
10. Холодильник побутовий, ТУ 84-89,
11. Скальпель (сертифікат якості ISO 9002)
12. Сухожарова шафа, В-151 ТЧ 64-1-1111-72
13. рН метр мілівольтметр, тип рН-150, ГОСТ 22261-8.-82

РЕАКТИВИ

1. Натрію фосфат однозаміщений, кваліфікація "ч" ГОСТ 245-76
2. Натрію фосфат двоаміщений, кваліфікація "чда" ГОСТ 4172-76
3. Натрію гідроксид, кваліфікація "чда" ГОСТ 4328-77
4. Глюкоза, кваліфікація "ч" ГОСТ 6038-51
5. Осмієва кислота (ампула 5,4 г), кваліфікація "ч", МП ТУ 6-09-2486-67
6. Кальцію хлорид, кваліфікація "ч" ТУ 609-45-76
7. Епоксидна смола Епон 812, Fluka AG, Chem. Fabrik CH-9470 Buchs
8. Епоксидна смола Епон DDSA, Fluka Chemie AG, CH-9470 Buchs
9. Епоксидна смола Епон MNA, Fluka AG, CH-9470 Buchs
10. Епоксидна смола DMP-30, "FERAK" BERLIN
11. Глютаровий альдегід 25 %, ТУ 6-09-10-1049-75
12. Спирт етиловий 96°, ГОСТ 5962-67
13. Мідний купорос п'яти водний, кваліфікація "чда" ГОСТ 897-68
14. Ацетон, кваліфікація "чда" ГОСТ 2603-79

РОЗЧИНИ

1 Фосфатний буфер 0,2 М, рН 7,4.

1-й розчин: 3% розчин натрію фосфату однозаміщений (наважку натрію фосфату однозаміщеного масою 3 г, взяту з точністю 0,005 г, розчинити в 97 мл дистильованої води, довести об'єм розчину до мітки, перемішати).

2-й розчин: 3% розчин натрію фосфату двохзаміщений (наважку натрію фосфату двохзаміщеного масою 3 г, взяту з точністю 0,005 г, розчинити в 97 мл дистильованої води, довести об'єм розчину до мітки, перемішати).

Змішати 23 мл 1-ого розчину та 77 мл 2-ого розчину. Перевірити рН розчину. Фосфатний буфер зберігається у холодильнику при $t +4 +8^{\circ}\text{C}$ протягом двох тижнів.

3-й розчин глутарового альдегіду: відміряти мірними циліндром 100 мл 0,2 М фосфатного буферу та 20 мл 25 % глутарового альдегіду, перемішати. Зберегти у холодильнику при температурі $+4^{\circ}\text{C}$. Термін зберігання необмежений.

4-й фіксатор за Міллонігом рН 7,3-7,4:

Натрію фосфат однозаміщений 6,71 % (наважку натрію фосфату однозаміщеного масою 0,67 г взяту з точністю 0,005 г, розчинити у 9,33 мл дистильованій воді, перемішати).

Натрію гідроксид 2,52% (наважку натрію гідроксиду масою 0,25 г взяту з точністю 0,005 г, розчинити у 9,75 мл дистильованій воді, перемішати).

Глюкоза 5,4% (наважку глюкози масою 0,54 г взяту з точністю 0,005 г, розчинити у 9,46 мл дистильованій воді, перемішати).

Осмієва кислота 2%. Ампулу, яка вміщує 5,4 г осмієвої кислоти, акуратно вимити, потім надпиляти, сполоснути дистильованою водою, помістити у дуже чисту темну склянку, куди налити 270 мл дистильованої води. Чистою склянкою паличкою розбити ампулу (під водою). Правильно приготований розчин повинен мати прозорий жовтуватий колір. Розчин зберігати тривалий час на холоді до появи в осаді темних кристалів.

Кальцію хлорид 1% (наважку кальцію хлориду масою 0,1 г взяту з точністю 0,005 г, розчинити у 9,9 мл дистильованій воді, перемішати).

Для приготування 25 мл фіксатора за Міллонігом змішати послідовно:

натрію фосфат однозаміщений 6,71% - 6,3 мл

натрію гідроксид 2,52% - 3,8 мл

глюкозу 5,4% - 2,5 мл

осмієву кислоту 2% - 12,3 мл

кальцію хлорид 1% - 0,1 мл.

Розчин перемішати, готувати перед використанням.

Приготування епоксидної смоли. Епоксидні смоли 812, DDSA, MNA, MP-30 попередньо помістити у термостат на 1 годину 37°C .

Приготувати суміші епоксидних смол А та Б:

Суміш А: Епон 812 – 6,2 мл
Епон DDSA – 10 мл

Суміш Б: Епон 812 – 10 мл
Епон MNA – 1,9 мл
DMP – 0,7 мл

Перемішати окремо суміші А і Б протягом 30-40 хв. Кожну суміш окремо приготувати впрок і зберігати у холодильнику до 1-2 місяців.

Перед використанням взяти рівні кількості суміші А і Б і знову їх перемішати ще 30-40 хв. Приготовлену суміш помістити у термостат на 37°C для видалення пухирців повітря. Епоксидну смолу готувати для використання.

1. 50% спирт: відміряти мірним циліндром 52 мл 96° спирту та 52 мл дистильованої води, перемішати.
2. 60% спирт: відміряти мірним циліндром 63 мл 96° спирту та 42 мл дистильованої води, перемішати.
3. 70% спирт: відміряти мірним циліндром 73 мл 96° спирту та 32 мл дистильованої води, перемішати.
4. 80% спирт: відміряти мірним циліндром 83 мл 96° спирту та 22 мл дистильованої води, перемішати.
5. 90% спирт: відміряти мірним циліндром 94 мл 96° спирту та 12 мл дистильованої води, перемішати.
6. 100% спирт: мідний купорос прожарити у сухожаровій шафі (до блях синього кольору), насипати у чисту скляну пляшку з притертою пробкою, налити 96° спирт (приблизно 10 г мідного купоросу на 100 мл 96° спирту). Потім пляшку струшувати до рівномірного розподілу порошку. Подібну процедуру повторюють на протязі 1-2 діб. По мірі поглинання води порошок надобуває синє забарвлення. Спирт перелити у другу пляшку, яка містить свіжу порцію мідного купоросу. Подібну процедуру повторити до тих пір, поки осад не перестане набувати голубого кольору. Обезводнений спирт відфільтрувати у чистий посуд, який щільно закривають.

ХІД ВИКОНАННЯ

Усі маніпуляції передфіксації, постфіксації, зневоднення необхідно проводити швидко і при температурі + 4° С.

1. Для передфіксації взяти матеріал на протязі 5-10 хв (розміром 4x4 мм) і помістити у 4% розчин глютарового альдегіду. Передфіксацію проводити терміном від 1 години до 14 діб.
2. Надрізати матеріал до розмірів 2x2 мм гострим скальпелем.
3. Відмивати матеріал у фосфатному буфері 4 рази по 30 хв.
4. Помістити матеріал у фіксатор за Міллонігом на 2 години.
5. Відмивати матеріал у фосфатному буфері 4 рази по 15 хв.

профасований та промитий матеріал провести через спирти висхідної концентрації. Для цього матеріал помістити послідовно у розчини спирту, по 15 хв кожний кожного розчину, по 10 хв: 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%.

Після зневоднення 70% спиртом можна залишити матеріал на 1 добу).

- а) Помістити матеріал послідовно у розчини по 15 хв:
 - а) спирт-ацетон у співвідношенні 3:1
 - б) спирт-ацетон у співвідношенні 2:1
 - в) спирт-ацетон у співвідношенні 1:1
 - г) спирт-ацетон у співвідношенні 1:2
 - д) спирт-ацетон у співвідношенні 1:3
 - е) спирт-ацетон у співвідношенні 0:1.

б) Помістити матеріал послідовно у розчини на 30 хв.:

- а) епоксидна смола – ацетон у співвідношенні 1:3
- б) епоксидна смола – ацетон у співвідношенні 1:1
- в) епоксидна смола – ацетон у співвідношенні 3:1.

в) Залити матеріал епоксидною смолою і помістити у термостат при температурі 37° С на 1 годину.

г) На дно желатинових капсул, які попередньо висушені у термостаті при температурі 37° С, накапати 1-2 краплі смоли, помістити 1-2 шматочки матеріалу, орієнтуючи у необхідному положенні, та залити смолою. Ярлик номером опустити зверху у желатинову капсулу зі смолою.

д) Для полімеризації смоли желатинові капсули з матеріалом помістити у термостат при таких температурах:

- перша доба – при 37° С;
- друга доба – при 45° С;
- третья доба – при 56° С;
- четверта-п'ята доба – при 60° С.

е) Полімеризовані блоки відмити від желатинових капсул. Термін зберігання полімеризованих блоків необмежений.

Література: Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. / Под ред. Полякова В.Ю. - М.: Мир, 1975. – с. 324.

2. ЗАЛИВКА ТКАНИНИ У ВОДОРОЗЧИНЕНУ ГМА-ГЛІКОЛЬ МЕТАКРИЛАТНУ СМОЛУ.

МЕТОД ОСНОВАНІЙ НА ФІКСУВАННІ, ВІДМИВАННІ, ПРОСОЧУВАННІ ТА ЗАЛИВАННІ МАТЕРІАЛУ У ГМА-ГЛІКОЛЬ МЕТАКРИЛАТНУ СМОЛУ

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

Терези електронні ВЛ Е - 134, ГОСТ 24104-88
Секундомір тип СОС пр. – 26-2- 000, ТУ 23-1894. 003-90

3. Колби мірні місткістю 150, 250 мл, ГОСТ 1770-74
4. Циліндри мірні місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74
5. Фільтрувальний папір, ГОСТ 12026-76
6. Піпетка скляна градуйована місткістю 5 мл, 2-й клас, ГОСТ 301-76
7. Желатинові капсули
8. Холодильник побутовий ТУ 84-89, тип ЕПШ-1-0,8, ГОСТ 14919-81
9. Скальпель, (сертифікат якості ISO 9002)
10. рН метр мілівольтметр, тип рН-150, ГОСТ 22261-8.-82
11. Склянка з темного скла
12. Плитка електрична з зак. сп., тип ЕПШ-1-0,8, ГОСТ 14919-81
13. Магнітна мішалка
14. Термостат ТС-80 М-2, ГОСТ 64-1- 1382-83

РЕАКТИВИ

1. Натрію фосфат двохзаміщений, кваліфікація "чда" ГОСТ 4172-76
2. Калію фосфат однозаміщений, кваліфікація "ч", ГОСТ 4198-65
3. Формалін, ТУ 6-09-3011
4. Кальцій вуглекислий, кваліфікація "хч" ГОСТ 5962-67
5. Глютаровий альдегід 25 %, ТУ 6-09-10-1049-75
6. Гліколь метакрилат (низько-кислотна), ("Sigma", США)
7. Бензоїл-пероксиду ("Sigma", США)
8. Поліетиленгліколь ("Sigma", США)

РОЗЧИНИ

1. 0,1 М фосфатний буфер (рН 7,4): наважки натрію фосфату двохзаміщеного масою 1,0 г та калію фосфату однозаміщеного, масою 0,005 г, розчинити у мірній колбі місткістю на 100 мл в невеликій кількості дистильованої води, перемішати. Довести об'єм до мітки перевірити рН розчину.

Зберігати у холодильнику при температурі +4 +8°С протягом двох тижнів.

2. 10% розчин формаліну (нейтральний) на 0,1 М фосфатному буфері: частину формаліну розвести 9 частинами 0,1 М фосфатного буфера. Перед фіксацією необхідно провести нейтралізацію формаліну вуглекислий кальцій засипати у посуд з формаліном в такій кількості, щоб на дні утворився шар товщиною 1,5 - 2,0 см. Формалін декілька разів енергійно збовтати і залишити на 24-48 год. Термін зберігання розчину необмежений.

3. Фіксуюча суміш по Карновській. Змішати 40 мл 0,1 М фосфатного буферу, 50 мл 10% розчину формаліну та 10 мл 25% глютарового альдегіду. Зберігати у холодильнику при t +4 +8°С, термін зберігання необмежений.

4. Неполімеризована GMA-гліколь метакрилатна смола. У склянці з темного скла змішати 100 мл гліколю метакрилату, 0,15 г бензоїла

...олу, 5,0 мл поліетиленгліколю. Ретельно перемішати. Розчин
...протягом 6 місяців, зберігається у холодильнику при
...температурі +4 +8° С. Перед використанням розчин повинно нагріти
...магнітної температури.

Це-полімеризована GMA-гліколь метакрилатна смола. Змішати 100
...метакрилату та 0,15 г бензоїла-пероксиду, Суміш поставити
...холодильник для кращого розчинення на 3 часи. Добре перемішати та
...колбу на 125 або 250 мл (шар розчину повинен бути 5-7 мм).
...нагрівати, постійно помішуючи. Розчин полімеризується, коли
...розчину робиться темніше (жовто-оранжевим) та починає згущатися.
...розчин починає полі-меризуватися, негайно погрузити колбу у
...водяну баню і ретельно перемішати до тих пір, поки розчин не
...до температури водяної бані. Це необхідно для запобігання
...швидкої полімеризації у колбі. Якщо в'язкість не досягається після
...нагрівання та охолодження, необхідно повторити процедуру
...разів, поки необхідно для досягнення бажаного кінцевого стану.
...справжня пре-полімеризована GMA-гліколь метакрилатна смола повинна
...в'язкість сиропу при температурі льодяної води. Маленькі повітряні
...у середині розчину повинні підніматися дуже повільно до поверхні.
...досягнута справжня в'язкість, необхідно підтримувати розчин при
...температурі, а потім додати 5,0 мл поліетиленгліколю на кожні
...мл пре-полімеризованої GMA-гліколь метакрилатної смоли.
...перемішати 1 час на магнітній мешалці. Розчин зберігати у морозилці
...протягом 2 місяців і довше.

Примітка: готувати пре-полімеризовану GMA-гліколь метакрилатну
...смолу під втяжною шафою.

85% розчин водної неполімеризованої GMA-гліколь метакрилатної
...смоли: змішати 85 мл неполімеризованої GMA-гліколь метакрилатної
...смоли та 15 мл дистильованої води. Готується перед використанням.

97% розчин водної неполімеризованої GMA-гліколь метакрилатної
...смоли: змішати 97 мл неполімеризованої GMA-гліколь метакрилатної
...смоли та 3 мл дистильованої води. Готується перед використанням.

ХІД ВИКОНАННЯ

1. Для передфіксації взяти матеріал на протязі 5-10 хв (розміром 4x4 мм) і
...помістити у фіксуєчу суміш по Карновські. Передфіксацію проводити
...терміном від 1 години до 14 діб.

2. Надрізати матеріал до розмірів 0,5-3,0 мкм гострим скальпелем.

3. Відмити матеріал у фосфатному буфері 2 рази по 30 хв.

4. Помістити матеріал у 85% водну неполімеризовану GMA-гліколь
...метакрилатну смолу на 30 хв.

Примітка: неpolімеризовану GMA-гліколь метакрилатну смолу відчиняти при кімнатній температурі. Розчинність неpolімеризованої GMA-гліколь метакрилатної смоли може бути збільшена підвищенням температури до 4-8° С.

5. Помістити матеріал у 97% водну неpolімеризовану GMA-гліколь метакрилатну смолу на 30 хв..

6. Помістити матеріал у 100% водну неpolімеризовану GMA-гліколь метакрилатну смолу на 12 часів та більше.

7. Залити матеріал у пре-polімеризовану GMA-гліколь метакрилатну смолу. Для цього матеріал промокнути на фільтрувальному папері дно желатинових капсул, які попередньо висушені у термостаті при температурі 37° С, накіпати 1-2 краплі смоли, помістити матеріал орієнтуючи у необхідному положенні, та залити смолою. Ярлик з номером опустити зверху у желатинову капсулу зі смолою, закрити кришку. Примітка: якщо у смолі є пухлинки повітря, дати капсулам постояти при кімнатній температурі протягом 30 хв до полімеризації для того, щоб пухлинки навколо тканини піднялися у верх.

8. Для полімеризації смоли желатинові капсули з матеріалом помістити в термостат при таких температурах: перша доба – при 40° С, другі дві останні доби – при 60° С до затвердіння смоли. Смолу можна вважати неpolімеризованою, якщо поверхня смоли стає білуватою або коли поперек не вдавлюється нігтем великого пальця.

9. Полімеризовані блоки відмити від желатинових капсул. Термін зберігання полімеризованих блоків необмежений.

Література: 1. Ruddell C.L. Embedding media for 1-2 micron sectioning // Stain Technol. – 1971. – Vol 42. – № 2. – P. 77-83. – 2. Kushida H. A new method for embedding with 2-hydroxypropyl methacrylate // Elec. Micro. – 1970. – Vol 10. – № 3. – P. 281-282.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ФАРБУВАННЯ ГІСТОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ НЕРВОВОЇ ТКАНИНИ ПО НІССЛЮ (модифікація)

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Забарвлення ґрунтується на перефарбуванні зрізів, фіксованих у спиртовому розчині аніліновим барвником з наступною відмивкою надлишку фарби спиртом. Отже, інтенсивно забарвлений матеріал чітко візуалізується і виділяється на незабарвленому фоні. Глибки тигроїда, ядерна оболонка інтенсивно сині або фіолетові, цитоплазма гангліозних та гліальних клітин - блідо сині, волокниста нервова речовина - не забарвлена.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

- Електронні ВЛ Е -134, ГОСТ 24104-88
- Цилиндромір тип СОС пр. – 26-2- 000, ТУ 28-1894. 003-90
- Конічні мірні місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74
- Конічні хімічні місткістю 50, 100 мл, ГОСТ 1770-74
- Мікроскоп біокулярний Биолам Р-П, (Ломо, Росія)
- Покривні скельця 18x18, ГОСТ 6672-75
- Предметні скельця, ГОСТ 9289-59
- Цилиндри мірні місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74
- Спиртівка.

РЕАКТИВИ

- Толуїдиновий синій, кваліфікація “ч” ТУ 887-53
- Ксилол, кваліфікація “ч” ТУ 6-09-3854-75
- Синадський бальзам, (“Sigma”, США)
- Спирт етиловий 96°, ГОСТ 5962-67

РОЗЧИНИ

- 0,1% розчин толуїдинового синього: наважку толуїдинового синього взяти 0,1 г, взяту з точністю 0,005 г, розчинити в 99,9 мл дистильованої води, перемішати. Термін зберігання необмежений.
- 70% спирт: відміряти мірним цилиндром 73 мл 96° спирту та 27 мл дистильованої води, перемішати.

ХІД ВИКОНАННЯ

- Занурити препарати двічі у ксилол на 2 хв. для видалення парафіну.
- Почергово занурити препарати у 96° спирт, 70% спирт, 40% спирт на кожний з 2 хв.
- Промити препарати дистильованою водою 2 хв.
- Зрізи перенести у 0,1% розчин толуїдинового синього.
- Гильню сторону покривного скельця підігріти над спиртівкою до появи пари, дати прохолонуті. Повторити процедуру нагрівання. Зрізи повинні бути дуже перефарбовані. Для досягнення більшого зафарбування після підігріву іноді можливо залишити зрізи у розчині барвника на деякий час (0,5-2 години) при кімнатній температурі або на ніч. Гарні результати досягаються фарбування у термостаті при температурі 37 – 40° С.
- Препарати промити у водопровідній воді 2 хв.
- Диференціювати у 96° спирті, змінюючи його по мірі забруднення (від 10 хв до декілька годин).
- Помістити препарати для просвітлення у ксилол на 2 хв.
- Заключити в бальзам (див. стандартну методику фарбування гістологічних препаратів за методом Браше).

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ФАРБУВАННЯ ГІСТОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ ЗАЛІЗНИМ ГЕМАТОКСИЛІНОМ ЗА ГЕЙДЕНГАЙНОМ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

За допомогою варіації часу протравлювання, фарбування і диференціювання препаратів метод дозволяє виявити ядра клітин, різні цитохімічні та деякі міжклітинні структури.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Терези електронні ВЛ Е-134, ГОСТ 24104-88
2. Секундомір тип СОСпр.-26-2-000, ТУ 23-1894. 003-90
3. Колби мірні місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74
4. Фільтрувальний папір – ГОСТ 12026-76
5. Стакани хімічні місткістю 50, 100 мл, ГОСТ 1770-74
6. Мікроскоп біокулярний Биолам Р-ІІ, (Ломо, Росія)
7. Покривні скельця 18x18, ГОСТ 6672-75
8. Скло предметне, ГОСТ 9289-59
9. Циліндри мірні місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74
10. Спиртівка.

РЕАКТИВИ

1. Залізоаміачні галуни, кваліфікація "ч" ТУ 09-53-59-88
2. Гематоксилін, ("Sigma", США)
3. Йдноватокислий натрій, кваліфікація "ч"
4. Ксилол, кваліфікація "чда" ТУ 6-09-91576-76
5. Канадський бальзам, ("Sigma", США)
6. Спирт етиловий 96°, ГОСТ 5962-67

РОЗЧИНИ

1. 10% розчин залізних галунів: наважку залізних галунів масою 10 г взяти з точністю 0,005 г, розчинити в 90 мл дистильованої води, перемішати. Термін зберігання необмежений.
2. 2,5% розчин залізних галунів: 10% розчин залізних галунів розвести в дистильованій воді у співвідношенні 1:3.
3. Розчин гематоксиліну: наважку гематоксиліну 1 г, взяти з точністю 0,005 г, перенести у мірну колбу місткістю 100 мл, додати 10 мл 96° спирту, перемішати і довести дистильованою водою до мітки. Відмітити

рідини у посуді і залишити розчин для "дозрівання" на 4-5 тижнів. Забезпечити постійний доступ світла та повітря (для цього шийку посуду потрібно прикрити складеною у декілька шарів марлею і при зварюванні розчину доливати воду до початкового рівня). Колір розчину змінюється з світло-коричневого до темно-коричневого. Перед використанням розчин розвести дистильованою водою у співвідношенні 1:1. Для швидкого виготовлення розчину гематоксиліну швидко отриманий розчин додати 0,1 г йодноватокислого натрію. Такий розчин можна використовувати через 1 годину.

10% спирт: відміряти мірним циліндром 73 мл 96° спирту та 27 мл дистильованої води, перемішати.

40% спирт: відміряти мірним циліндром 42 мл 96° спирту та 58 мл дистильованої води, перемішати.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

1. Занурити препарати двічі у ксилол на 2 хв. для видалення парафіну.
2. По чергово занурити препарати у 96° спирт, 70% спирт, 40% спирт на протязі 2 хв.

3. Промити препарати дистильованою водою 2 хв.

4. Висушити зрізи фільтрувальним папером та покрити 2,5% розчином еозинних галунів.

5. Гільну сторону покривного скельця підігріти над спиртівкою до з'явлення пари, дати охолонути. Повторити процедуру нагрівання 2-3 рази.

6. Змити галуни, не промивати, накапати гематоксилін і знову підігрівати до появи пари. (Фарбування проводити до тих пір, поки зріз не набуде чорно-чорний колір).

7. Препарати промити у дистильованій воді, залити 2,5% розчином еозинних галунів. За ходом диференціювання стежити під мікроскопом.

8. Препарат промити у двох змінах дистильованої води, потім у проточній воді.

9. Перенести препарати для обезводнення в 96° спирт на 2 хв.

10. Помістити препарати для просвітлення у ксилол на 2 хв.

11. Заключити в бальзам (див. стандартну методику фарбування гистологічних препаратів за методом Браше).

Примітка: Час протравлювання фарбування і диференціювання визначається дослідним шляхом та залежить від якості реактивів, властивостей досліджуваного об'єкту, мети та завдань досліду.

Література: Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии с гистологической техникой. – М.: Медицина, 1971. – С. 205-207.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ІМПРЕГНАЦІЇ СРІБЛОМ ДЕГЕНЕРУЮЧИХ ВОЛОКОН У ГОЛОВНОМУ МОЗКУ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Дегенеруючі аксони завдяки імпрегнації сріблом забарвлюються в темно-коричневий колір та контрастно виділяються на світло-коричневому фоні.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Терези електронні ВЛ Е - 134, ГОСТ 24104-88
2. Секундомір тип СОС пр. - 26-2- 000, ТУ 23-1894. 003-90
3. Колби мірні місткістю 50, 100 мл, ГОСТ 1770-74
4. Фільтрувальний папір, ГОСТ 12026-76
5. Стакани хімічні місткістю 50 мл, ГОСТ 1770-74
6. Мікроскоп біокулярний Биолам Р-ІІ, (Ломо, Росія)
7. Покривні скельця 18x18, ГОСТ 6672-75
8. Предметні скельця, ГОСТ 9289-59
9. Циліндри мірні місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74

РЕАКТИВИ

1. Ацетат уранілу 0,02 М, OLUIBE
2. Нітрат срібла, кваліфікація "чда", ГОСТ 4197-74
3. Спирт етиловий 96°, ГОСТ 5962-67
4. Амонію гідроксид, кваліфікація "чда", ГОСТ 5815-77
5. Натрію гідроксид, кваліфікація "чда" ГОСТ 4328-77
6. Кислота лимона, кваліфікація "хч" ГОСТ 3652-69
7. Формалін, ТУ 6-09-3011-73
8. Тіосульфат натрію, кваліфікація "чда" ГОСТ 4215-66
9. Ксилол, кваліфікація "ч" ТУ 6-09-3854-75
10. Канадський бальзам, ("Sigma", США)
11. Кальцій вуглекислий, кваліфікація "хч" ГОСТ 5962-67

РОЗЧИНИ

1. 1,5% розчин нітрат срібла: наважку нітрату срібла 1,5 г, взяту з точністю 0,005 г, розчинити в 98,5 мл дистильованої води, перемішати.
2. 2,5% розчин натрію гідроксиду: наважку натрію гідроксиду 2,5 г, взяту з точністю 0,005 г, розчинити в 97, 5 мл дистильованої води перемішати.
3. 10% розчин формаліну (нейтральний): 1 частину формаліну розвести частинами водопровідної води. Перед фіксацією необхідно провести

формаліну: вуглекислий кальцій засипати у посуд з розчином в такій кількості, щоб на дні утворився шар товщиною 1,5-2 мм. Формалін декілька разів енергійно збовтати і залишити на 24-48 годин термін зберігання розчину необмежений.

10% розчин тіосульфату натрію: наважку тіосульфату натрію масою 0,5 г, точністю 0,005 г, розчинити в 95,5 мл дистильованої води, перемішати.

70% спирт: відміряти мірним циліндром 73 мл 96° спирту та 27 мл дистильованої води, перемішати.

40% спирт: відміряти мірним циліндром 42 мл 96° спирту та 58 мл дистильованої води, перемішати.

Розчин 1: відміряти мірним циліндром 10 мл 0,02 М ацетату уранілу, додати 0,05 мл 96° спирту, перемішати.

Розчин 2: відміряти мірним циліндром 160 мл 1,5 % розчину нітрату цинку, 96 мл етилового спирту 96°, 20 мл гідроксиду амонію, 14,4 мл 10% розчину натрію гідроксиду, перемішати. Розчин готувати перед використанням.

Розчин 3 (що відновлює): мірним циліндром відміряти 400 мл дистильованої води, 45 мл спирту 96°, 13,5 мл 10 % розчину формаліну, перемішати.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

- Зрізи (без депарафінізації) інкубувати у розчині 1 протягом 3 хв.
- Без відмивки помістити зрізи у розчин 2 на 4-5 хв.
- Без відмивки зрізи помістити на 3 хв у розчин 3.
- Зрізи промити і помістити в 0,5 % розчин тіосульфату натрію.
- Зрізи промити і помістити послідовно на 2 хв. у 40 %, 70 %, 96° спирти.
- Для депарафінізації зрізи помістити у дві порції ксилолу на 2 хв.
- Помістити препарати для просвітлення у ксилол на 2 хв.
- Помістити препарати для просвітлення у ксилол на 2 хв.
- Заключити в бальзам (див. стандартну методику фарбування гистологічних препаратів за методом Браше).

Література: Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Дж. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения.- М.: Москва, 1991. – С.33-34.

РОЗДІЛ 7. МЕТОДИ ІНДУКЦІЇ ПАТОЛОГІЧНИХ СТАНІВ

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВІДТВОРЕННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ДІАБЕТУ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Введення алоксану тваринам викликає пошкодження підшлункової залози і нирок за рахунок переокисних механізмів. Алоксан - біла кристалічна речовина, являє уреїд мезоксалевої кислоти, розчиняється у воді, ефірі та спирті.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Терези аналітичні ВЛА-2ч, ГОСТ 19491-74
2. Шприц ін'єкційний ("Гемопласт, Луер")

РЕАКТИВИ

1. Алоксан («Сметарол», Чехія)
2. Набор для визначення рівня глюкози в сироватці крові ("Ремат Угорщина)

ХІД ВИКОНАННЯ

Відтворення алоксанового діабету на щурах:

1. Відібраним та витриманим на карантині (адаптаційний період 10 днів) тваринам вводити одноразово підшкірно 100 мл/кг 5 % водного розчину алоксана. Через 7 днів після введення алоксана визначити концентрацію глюкози в сироватці крові.

Відбирати тварин з глікемією не менш ніж 10 ммоль/л. Тваринам, у яких вміст глюкози в крові після одноразового введення алоксану складає нижче ніж 10 ммоль/л, алоксан ввести повторно в дозі 150 мг/кг, вагу тварин і рівень глюкози визначити на 10 та 21 дні.

2. Критерієм розвитку патології є глюкозурія, полідеспепсія, поліурія та прояви ангіопатій. При наступних введеннях (якщо після першої ін'єкції діабет не виник) потрібно збільшити дозу внаслідок виникаючої резистентності до алоксану: при цьому виникає вже не стільки діабетичний, скільки загально-токсичний ефект. Відтворюваність моделі складає 85%. Алоксановий діабет протікає в формі токсичної реакції (діабетико-уремічний синдром), гострого діабету (супроводжується загибеллю тварин на 5-10 день від ацидозу), хронічного діабету, приступоподібного діабету (у щурів - перехідний діабет, який самовиліковується за 3-4 тижні).

діабету. У щурів, що отримували алоксан, в кістковому
тканині збільшується кількість мутантних клітин. Можлива виражена
чутливість до алоксану.

Література: 1. Ефимов А.С., Гордисенко В.М., Ткачук Ю.В., Эксперим.
исследование диабетических ангиопатий // Физиол. журн.- 1981-№1-С.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА УНІЛАТЕРАЛЬНОЇ НЕФРЕКТОМІЇ З АЛОСТАТИЧНОЮ ТРАНСПЛАНТАЦІЄЮ НИРКИ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

У щурів щурів видаляють одну з нирок та перехресно підсаджують у
іншу. Дослідження ведуть попарно.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

Хірургічний набір: ножиці, пінцет, скальпель, корнцанг, (сертифікат
стандарту ISO 9002).

Основний матеріал (кетгут), ТУ У.570-46.38.002-91

РЕАКТИВИ

Стерильний фізіологічний розчин ("Біофарма", Київ).

Стрептоміцину сульфат, (ВАТ «Київмедпрепарат», Україна).

Лікертовий 5% розчин йоду (Фармфабрика, м. Миколаїв, Україна)

Тіопентал-натрія, (ВАТ «Київмедпрепарат», Україна)

ХІД ВИКОНАННЯ

Виконати внутрішньочеревний наркоз (10% розчин тіопенталу
у тваринам внутрішньочеревно в дозі 0,25 - 0,5 мл).

Одночасно наркотизувати двох тварин, зрізати шерсть, обробити йодом.

Зробити середину лапаротомію (розріз 1-1,5 см). Виділити та

зв'язати ліву ниркову артерію, а потім - вену. Відсікнути нирку. Таку

маніпуляцію провести і для другої тварини.

Віддалені нирки декапсулювати і розрізати на пластинки не товщі 2-4

мм. Пластинки нирок перехресно підсаджувати в сальник. Ложе

трансплантату повинно бути ретельно звільнено від згустків, ексудату.

Необхідно старанно проводити гемостаз. Трансплантат при необхідності

фіксувати до сальника 1-2 тонкими стібками.

Зшити пошарово передню черевну стінку кетгутом. Рану обробити йодом

і ввести стрептоміцином.

Примітка: У щурів алаптація заміненої нирки йде протягом 7-10 даними азотного обміну. Процеси інфільтрації трансплантату нефрону починаються вже за 4 години.

Література: Кайдашев І.П. Вивчення специфічної до нефрону комплексу нирок під час унілатеральної нефректомії з алаптацією трансплантацією нирки у щурів // ФАРМАКОМ. - 1992. - № 1. - С. 31-37.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВІДТВОРЕННЯ ФТОРИСТОГО НЕФРИТУ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

В основі токсичної дії іонів фтору є активація процесів перекисного окислення ліпідів та пряма пошкоджуюча дія.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Зонд для внутрішньошлункового введення.
2. Шприци ін'єкційні, («Гемопласт, Луер»).

РЕАКТИВИ

1. Фторид натрію, кваліфікація «чда», ГОСТ 4233-77

РОЗЧИН

Розчин готувати з розрахунку введення дози реактиву з урахуванням маси тварин та об'єму розчину, який вводиться тваринам.

ХІД ВИКОНАННЯ

1. Відібрати лабораторних тварин (найкраще щури та морські свинки) за вагою та витримати в карантині 10-14 діб.
2. Тваринам ввести розчин фториду натрію в дозі 100 мг/кг внутрішньо-шлунково (об'єм не більше 0,5 мл) або підмішати в їжу такої самій дозі.
3. Введення фториду натрію триває 14 діб. Примітка: У паренхімі нирки спостерігаються великі тромби поблизу стінок судин, некроз дистальних проксимальних каналців, їх розширення та дистрофія. Одночасно спостерігаються зміни, особливо поблизу центральних вен, гіпохромія та некроз ядер, розширення кровоносних судин, тромби, виявляється інфільтрація клітин мононуклеарами.

Література: Кайдашев І.П., Міщенко В.П. Вплив регуляторних ниркових поліпептидів на гемокоагуляцію і перекисне окислення ліпідів при фторидній токсикації // Физиол. журн. - 1993. - Т. 39, № 2-3. - С. 67-71.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ІНДУКЦІЇ ІМУНІТЕТУ ВІД ІМУНІЗАЦІЇ ПОШКОДЖЕНЬ ОРГАНІВ

**(печінки, нирок, підшлункової залози, шлунку,
підшлункової залози, судин, серця, головного мозку та інш.)**

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Виконують лабораторних тварин емульсією гомогенату тканин та ад'ювантом Фрейнда.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

Необхідний набір: ножиці, пінцет, скальпель, корнцанг, (сертифікат ISO 9002).

Гомогенат тканини (1 мл гомогенату повинен містити 20 мг білку) див. стандартну методику підготовки тканинних антигенів» (полегшений варіант).

Ад'ювант Фрейнда (ланолінова та вазелінова олія, змішані в співвідношенні 1:2 з додаванням 20 мг/мл сухої вакцини БЦЖ).

Шприц ін'єкційний («Гемопласт, Луер»)

ХІД ВИКОНАННЯ

Готувати лабораторних тварин, перевага віддається щурам.

Гомогенат тканин змішати з ад'ювантом Фрейнда у співвідношенні 1:1. Багато разів протискувати через шприц приготувати емульсію. Якість емульсії повинна бути така, щоб крапля її у воді не руйнувалась на протязі 30 хв.

Тварин імунізувати емульсією підшкірно або в пучки лап. Вводити 0,3-0,5 мл емульсії на тварину трикратно через 5-7 діб.

Максимум патології досягає максимуму на 4-5 день після останньої імунізації.

Примітка: Така методика може викликати ад'ювантну хворобу, вельми швидко впливаючи на результати експерименту. Введення самого ад'юванта може викликати артрит Пірсона, який сам може бути експериментальною патологією.

Увага! Потрібно дуже точно дозувати білок.

Література: Kment A., Hofecker G., Niedermiller H., Dreier H. Spezifische Ablagerung markierter Gewebshogenate in die homoioenen Organ der Ratt // Zeitschrift für Immunologie - Forsch. - 1976. - Bd 26, N11 - S.2043 - 2046.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ПІДГОТОВКИ ТКАНИННИХ АНТИГЕНІВ (ПОЛЕГШЕНИЙ ВАРІАНТ)

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Готують водно-сольовий екстракт антигенів різних тканин.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Хірургічний набір: ножиці, пінцет, скальпель, кориниан (якості ISO 9002).
2. Фарфорова ступка.
3. Відмитий пісок
4. Холодильник побутовий, ТУ 84-89
5. Термометр до 100° С, ГОСТ 2823-73
6. Центрифуга лабораторна ОПН-3 УХЛ-4.2, ТУ 5375-12-81
7. Терези електронні ВЛ Е-134, ГОСТ 24104-88
8. Колба мірна місткістю 1000 мл, ГОСТ 1770-74

РЕАКТИВИ

1. Хлорид натрію, кваліфікація «хч» ГОСТ 4233-77
2. Набір реагентів для визначення вмісту білка (див. «Стандартизоване визначення концентрації білку в слині методом Лоурі»).

РОЗЧИНИ

1. Хлорид натрію 0,9% розчин: наважку хлориду натрію з точністю 0,005 г перенести в мірну колбу місткістю 1000 мл з 950 мл дистильованої води, розчинити при перемішуванні розчинення реактиву, довести дистильованою водою до перемішати.

ХІД ВИКОНАННЯ

1. Шматочки тканини брати у тварин суворо дотримуючись асептики. Їх одразу охолодити і всі наступні операції робити на холоді.
2. Тканину подрібнити ножицями та промити холодним ізотонічним розчином до видалення крові. Потім перенести у ступку з кварцовим піском (можна використовувати шматочки скла від битого посуду), додати декілька мл ізотонічного розчину і старанно розтерти.
3. Гомогенну масу перенести в колбу та розчинити у співвідношенні 1:4 ізотонічним розчином, перемішати та дати відстоятись при температурі +4°С 16-20 годин.
4. Надосадову рідину центрифугувати 30 хв при 3000 об/хв при температурі +4°С.
5. Визначити вміст білку по Лоурі або біуретовим методом в гомогенаті. Екстракт розлити в ампули, закупорити, зберігати при температурі +4°С.

Примітка: Кожна порція антигену не підлягає повторному заморожуванню.

Література: Иммунологические методы / Под ред. Г. Фримеля. М.: Медицина, 1987. – 472 с.

5. Через 9 діб після останньої ін'єкції качок знекровити підшкірно-жирову тканину та зібрати кров за допомогою лійки (стерильно!). З однієї качки отримати до 100-120 мл сироватки. Сироватку розлити в пляшечки та заморозити.

6. Нефрит Masugu відтворити на лінійних щурах. Щурам ввести сироватку внутрішньовенно, щодобово, на протязі 3 діб. У першу дозу ввести сироватку на перший день - 0,5 мл, на 2-й - 0,7 мл; на 3-й - 1 мл. Примітка: сироватку можна отримувати шляхом імунізації кроликів, вони його погано переносять та сироватка менш активна.

Література: Иммунологические методы / Под ред. Г. Фрэнкель. Медицина, 1987. - 472 с.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВІДТВОРЕННЯ АУТОІМУННОГО ПОШКОДЖЕННЯ СУДИН

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Собак імунізують водно-сольовим екстрактом великих артерій та вен судин, що викликає розвиток реакції гіперчутливості сповільненого типу.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Хірургічний набір: ножиці, пінцет, скальпель, корнцанг, (сертифікації якості ISO 9002).
2. Терези електронні ВЛ Е-134, ГОСТ 24104-88
3. Ступка з товчачиком
4. Гомогенізатор Потера
5. Магнітна мішалка
6. Холодильник побутовий, ТУ 84-89
7. Термометр до 100° С, ГОСТ 2823-73
8. Центрифуга лабораторна ОПН-3, ТУ 5375-4260-76
9. Лійки скляні, ГОСТ 1770-74
10. Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74
11. Пробірки хімічні, ГОСТ 25336-82
11. Пісок
12. Фільтрувальний папір, ГОСТ 12026-76
13. Фільтри «Міліпор» або керамічні

РЕАКТИВИ

1. Набір реагентів для визначення вмісту білка (див. «Стандартна методика визначення концентрації білку в слині методом Лоурі»).
2. Сироватка собаки

Література: Витковський Ю.А. Влияние полипептидов иезина на коронарный гемостаз и неспецифическую резистентность организма в эксперименте. Канд. мед. наук: 14.00.25 - Чита, 1989. - 196 с.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВІДТВОРЕННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ГОСТРОЇ ІШЕМІЇ МІОКАРДА

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Внаслідок перев'язки судини розвивається ішемія, а потім міокарду внаслідок недостачі кисню.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Хірургічний набір: ножиці, пінцет, скальпель, корнцанг (стандарт якості ISO 9002).
2. Шприци для ін'єкцій, («Гемопласт, Луер»).

РЕАКТИВИ

1. Стрептоміцину сульфат, (ВАТ «Київмедпрепарат», Україна)
2. Тіопентал-натрія, (ВАТ «Київмедпрепарат», Україна)

ХІД ВИКОНАННЯ

Статевозрілим щурам масою тіла 180-200 г під тіопенталовим наркозом зробити трахеостомію, перевести на ручне штучне дихання (шприком заповітря, що вводять 3-4 мл, частота 10-12 рази за хв). Розіпнути грудну клітку зліва, перев'язати ліву коронарну артерію в нижній третині. Заповнити порожнину повітрям, захити грудну клітку, продовжити штучне дихання до відновлення природного дихання. Захити трахеостому. Рани присипати антибіотиком. Смертність тварин залежить від пори року, в середньому досягає 50%.

Контроль розвитку інфаркту проводити за показниками електричної діограми та гістологічними дослідженнями.

Література: Моделирование поражений миокарда различной степени выраженности. Резников К.М., Леонов А.Н., Кигаева Р.И. и др. // Биол. мед. биол. и мед. - 1985. - N5. - С. 532-534.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВІДТВОРЕННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГОСТРОГО ІЗАДРИНОВОГО ІНФАРКТУ МІОКАРДА

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Ізадрін, який є адреноміметиком та викликає підсилення використання кисню в тканинах міокарду. Внаслідок невідповідності кількості кисню в циркулюючій крові потребам міокарду розвивається гіпоксія, некроз, дисфункція

РОЗЧИНИ

1. Етилендіамінтетраацетат натрію 10% розчин: наважку етилендіамінтетраацетату натрію 10,0 г зважену з точністю 0,005 г перенести в колбу місткістю 100 мл, додати невелику кількість дистильованої води, перемішати, довести до мітки.

2. Забуферний формалін (нейтральний) 10% розчин: 1 частину формаліну розвести 9 частинами водопровідної води. Перед фіксацією необхідно провести нейтралізацію формаліну: вуглекислий кальцій застосовувати разом з формаліном в такій кількості, щоб на дні утворився шар товщиною 2,0 см. Формалін декілька разів енергійно збовтати і залишити на 24 год. Термін зберігання розчину необмежений.

ХІД ВИКОНАННЯ

Найбільш придатні лабораторні тварини - білі щури. Еластичну смужку розмістити між першим та другим молярами верхньої щелепи щуро. Цей простір між зубами виявляється малим, зуби роздвинуті за допомогою скальпеля. Смужку видалити через тиждень.

Критерії розвитку патології:

- інфільтрація тканин пародонту клітинами запалення,
- резорбція альвеолярного відростку.

Методика обробки комплексу тканини (пародонт, зуб, кістка)

Видалити зуб з навколишніми тканинами (пародонт, альвеолярний відросток) за допомогою хірургічного інструментарію. Комплекс тканин фіксувати 10 % нейтральним формаліном (краще забуференою формаліном) на протязі 7-10 діб. Після фіксації комплекс тканин промити 24 години проточною водою, обсушити сухою ганчіркою і декальцинувати. Декальцинацію провести 10% розчином етилендіамінтетраацетату натрію (під час приготування стежити за рН) на протязі 14 діб. Треба слідкувати, щоб тканини були розташовані у верхньому шарі розчину.

Після декальцинації без відмивки залишків розчину тканини знежирити в етанолі та залити у парафін по стандартним методикам.

Для вивчення рекомендується забарвлювати зрізи гематоксин-еозинном, по Ван Гізону, по Малорі. Така обробка на сьогодні є унікальною тому, що залишає м'які тканини повністю не зруйнованими, не порушуючи гістотопографію тканин.

Література: Yoshihiro Abiko, Masaki Shimonon/Regeneration of periodontal tissues following experimentally induced periodontitis in rats: The comparison of sucrose rich and Conventional Diets // Bull.Tokyo dent Coll. - 1989.- Vol. 30, No. 4 P. 195-204.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА

ІНДУКЦІЯ ГОСТРОГО НАБРЯКУ ЗАПАЛЕННЯ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Метод оснований на здатності деяких природних речовин викликати гостре запалення за рахунок взаємодії з компонентами сполучної тканини.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

Стерильні мірні місткості 100 мл, ГОСТ 1774-74
Електроінструменти ВЛ Е-134, ГОСТ 24104-88
Шприци для ін'єкцій, («Гемопласт, Луер») (100 шт.)
Стерильні лабораторні ВЛР-200, 2-й клас, ГОСТ 19491-74
Об'єметр для вимірювання об'єму кінцівок.
Циліндр мірний місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74

РЕАКТИВИ

Каррагенін
Агар Дифко Bactoagar D ("Type Usa" Ferak Berlin)
Формалін, ТУ 6-09-3011
Стерильна вода для ін'єкцій ("Дарниця", Україна)
Медицинський спирт 96°, ГОСТ 5962-67

РОЗЧИНИ

Флогогенний агент - до складу входить:
10% водний розчин карагеніну;
10% водний розчин агару;
10% водна суміш каоліну;
10% водний розчин формаліну.
10% розчин етанолу 70% спирт: відміряти мірним циліндром 73 мл 96° спирту
100 мл дистильованої води, перемішати. Термін зберігання необмежений.

ХІД ВИКОНАННЯ

Модель бажано відтворювати на білих мишах і щурах. Відібрати тварин по масі, статі і віку і розподілити по групам. Виміряти об'єм лапи голіковий суглоб за допомогою онкометру. Обробити кінцівки 70% розчином етанолу двічі (звичайно використовувати задню лапу). Ввести плантарно флогогенний агент: розчини карагеніну, каоліну, формаліну по 0,1 мл (для щурів) і агару по 0,15 мл. Максимальне розвинування набряку досягається через 4 год.

Застосування. Дана модель застосовується для вивчення впливу речовин на гострий процес запалення і оцінки цього впливу. Найбільш підходить

для викриття і дослідження антиексудативних властивостей. Рекомендують вивчають, рекомендується вводити відповідно припустимому швидкості клініці за 1 години до введення флогогенного агенту. При зниженні ефекту менш 30% подальше вивчення антиексудативної дії мало перспективне.

Література: Методические рекомендации по экспериментальному изучению нестероидных противовоспалительных веществ. Тринус Ф.П., Костанов В.В., Кондратюк В.И. и др. / М.: Медицина, 1982.- 16 с.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВІДТВОРЕННЯ АЛЕРГІЧНОГО МІОКАРДИТУ І КРОЛІВ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Сенсибілізованним тваринам вводять дозволяючу дозу антигену безпосередньо в міокард, де і розвивається місцеве запалення. При цьому зменшується можливість розвитку анафілактичної шоків реакції.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Нормальна коняча сироватка (АО «Біолек», м. Харків).
2. Ін'єкційні шприци ("Гемопласт Луер") та довга тонка голка для спинномозкової пункції.
3. Терези електронні ВЛ Е-134, ГОСТ 24101-88
4. Хірургічний набір: ножиці, пінцет, скальпель, корнцанг, (сертифікації якості ISO 9002).
5. Ефір для наркозу стабілізований (м. Шостка, Україна)
6. Дротяно-марлева маска.

ХІД ВИКОНАННЯ

Кролякам ввести нормальну конячу сироватку 0,5 мл/кг внутрішньовенно у вену вуха. Сироватку ввести трикратно через день. На 21 добу після останньої ін'єкції сенсибілізуючої дози ввести дозволяючу дозу антигену. Для цього кролика ввести в поверхневий ефірний наркоз і ввести 0,5 мл сироватки в товщу серцевого м'язу. Введення можна здійснити двома шляхами. Додержуючись правил асептики розігнути грудну клітку безпосередньо під візуальним контролем ввести сироватку. Антибіотики бажано не використовувати (якщо все ж таки використовуються, то в протоколі необхідно це описати). Другий метод вимагає певної майстерності. Після визначення пальцями серцевого пошттовху, в його область обережно повільно ввести голку для спинномозкової пункції. Голку пересувати обережними пошттовхами, періодично відпускаючи голку і спостерігати за її рухами. В той момент, коли голка ввійде в міокард, вона починає колихатися

супресивним скороченням. Якщо з голки з'являється кров, її необхідно негайно відтягнути (необхідно не допускати появи крові).

Використання. Модель застосовується для поглибленого вивчення протизапальної дії агентів, що вивчаються. Хімічні речовини вводяться вводити 2 рази на добу в дозі 1/10 LD50, яка ділиться на 2 частини. Якість протизапального ефекту оцінюють перш за все на основі морфологічних змін у міокарді в динаміці (3,7,14 і т.д. добу).

Література: Мойбелко А.А., Саган В.Ф., Попович Л.Ф. Иммуные повреждения // Под ред. Е.А. Чазова. В.Н. Смирнова. М.: Наука. – 1987. – С. 287-307.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВІДТВОРЕННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ІМУННОГО АРТРИТУ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

При введенні тваринам повного ад'юванта Фрейнда відбувається активація імунної системи (більше всього, за рахунок блокади супресорної функції Т-лімфоцитів) і перехресна імунна відповідь. В літературі ця модель отримала назву ад'ювантний артрит Пірсона.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

Повний ад'ювант Фрейнда (1 частина ланоліну, 2 частини вазелінового масла, БЦЖ-вакцина із розрахунку 5 мг/мл).
Шприци для ін'єкцій, ("Гемопласт, Луер")

ХІД ВИКОНАННЯ

Відтворення моделі найкраще на щурах (до 90%). Тварини розділити на групи відповідно статі, віку, масі. Тваринам вводити по 0,1 мл попередньо нагрітого до 38-40° С ад'юванта, субплантарно. На 2-3 день розвивається сильне запалення зі збільшенням об'єму враженої лапи зі всіма класичними ознаками запалення. Максимум цієї реакції настає на 2-4 добу. Через 10-14 днів після введення ад'юванта в 80-90% тварин розвиваються ознаки загальної реакції - набряк кінцівок, вух, хвоста, кон'юнктивіти, кератити, ксеродермія. Важливість цих симптомів зростає і без лікування настає загибель тварин.

Використання. Модель використовується для вивчення цитостатичних, протизапальних і імуносупресивних ефектів. Вплив дослідних агентів оцінюють по їх здатності зменшувати набряк, хворобливість кінцівок, нормалізувати стан морфоструктур суглобів. При оцінці профілактичної дії агент повинен впливати з 1 дня після введення ад'юванта з оцінкою дії на 13-15 добу, при вивченні лікувальної дії - з 13-14 доби по 30 добу. Контрольна доза хімічних речовин 1/10 LD50.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВІДТВОРЕННЯ ПІДВИЩЕНОЇ ПРОНИКЛИВОСТІ СУДИН ЧЕРЕВНОЇ ПОРОЖНИНИ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Метод оснований на судинно-токсичній дії оцтової кислоти, яка викликає підвищення проникливості. Підвищення проникливості судин розумно контролюється по виходу барвника (синього Еванса) із судин в черевну порожнину.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Шприци для ін'єкцій ("Гемопласт, Луер")
2. Центрифуга ОПН-3 УХЛА4.2, ТУ 5-375-42-6076
3. Колориметр фотоелектричний концентраційний КФК-2-УХП 4.2, ТУ 3-3. 1766-82
4. Секундомір тип СОС пр. – 26-2-000, ТУ 23-1894.-003-90
5. Терези електронні ВЛ Е –134, 2-й клас ГОСТ 104-88
6. Колба мірна місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74
7. Холодильник побутовий, ТУ 84-89
8. Піпетка скляна градуйована місткістю 1,0 мл, 2-й клас ГОСТ 20191-80
9. Термостат ТС-80М-2, ТУ 64-1-1382-83

РЕАКТИВИ

1. Кислота оцтова льодяна, кваліфікація "хч", ГОСТ 61-75
2. Натрій хлористий, кваліфікація "ч", ГОСТ 4233-77
3. Барвник синій Еванс

РОЗЧИНИ

1. Хлорид натрію 0,9% розчин: наважку хлориду натрію масою 0,9 г зважену з точністю 0,005 г перенести в мірну колбу місткістю 100 мл, додати невелику кількість дистильованої води, перемішати. Довести об'єм до мітки, перемішати. Зберігати при температурі + 4-8°С протягом двох тижнів.
2. Розчин синього Еванса 0,5% розчин в 0,9% розчині натрію хлориду: наважку синього Еванса масою 0,5 г зважену з точністю 0,005 г перенести в мірну колбу місткістю 100 мл, додати невелику кількість хлориду натрію 0,9%, розчинити, перемішати, довести об'єм до мітки.
3. Розчин 0,05% льодяної оцтової кислоти: 0,05 мл льодяної оцтової кислоти перенести в мірну колбу місткістю 100 мл, долити до мітки 0,9% розчину хлориду натрію, перемішати.

ХІД ВИКОНАННЯ

Метод розрахований на використання білих щурів. Підігріти до 37°С 0,05% розчин льодяної оцтової кислоти, ввести внутрішньочеревно в об'єм

Бали по кожній плямі додати (максимально можлива ступінь інтенсивності забарвлення у кожній тварини 16 балів).

Застосування. Модель використовується для вивчення протиприродних ефектів речовин. Речовини вводять за 30 хв до опромінення і через 2,5 год після нього. Враховують ступінь пригнічення гіперемії у тварин порівняно з контролем (100%), обробляють методом варіаційної статистики. Іноді для більшої чіткості результатів при опроміненні у тварин блокують стероїдогенез (адреналектомія, метипред).

Література: Нестероидные противовоспалительные препараты / Ф.П., Мохорт Н.А., Клебанов Б.М. / Київ: Здоров'я, 1975. - 219 с.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВІДТВОРЕННЯ КАРАГІНІНОВОГО ЗАПАЛЕННЯ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Карагінін - це полісахарид морської водорості, $M = 1$ млн Да, складає галактопіранозні залишки, котрі зв'язані з такими ж по відношенню до 4, іноді 3-6 глікозидним зв'язкам, сульфатовані по 2, або 4, або 6 до вуглецю. При введенні в тканини викликає неспецифічне асептичне антигеннезалежне запалення. В гранулемах, які після цього утворюються, більша частина макрофагів заповнена цією речовиною, ці макрофаги діляться та мають довге життя - більше 2 місяців. Супероксидний метаболізм гальмує розвиток карагінінового набряку кінцівки у щурів, б-токоферол неефективний при цьому, але гальмує утворення гранульом в печінці легень при внутрішньовенному введенні карагініну.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Шприц для ін'єкцій інсуліну ("Гемопласт, Луер")
2. Терези електронні ВЛ Е-134, 2-й клас ГОСТ 104-88
3. Колба мірна місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74

РЕАКТИВИ

Карагінін

РОЗЧИНИ

1% розчин карагініну: наважку карагініну масою 1 г зважену з точністю 0,005 г перенести в мірну колбу місткістю 100 мл, додати невелику кількість дистильованої води, розчинити, перемішати, довести об'єм до мітки.

ХІД ВИКОНАННЯ

В задню лапу щурів зробити ін'єкцію 0,1 мл 1,0% розчину карагініну. Розвивається набряк тканини максимально за 1-2 години.

РЕАКТИВИ

Фторид натрію, кваліфікація «чда», ГОСТ 4233-77

РОЗЧИНИ

1. Фторид натрію 3% розчин: наважку фториду натрію масою 3 г з точністю 0,005 г перенести в мірну колбу місткістю 100 мл, розчинити у невеликій кількості дистильованій воді, перемішати, довести об'єм розчину до мітки.
2. Фторид натрію 1% розчин: наважку фториду натрію масою 1 г з точністю 0,005 г перенести в мірну колбу місткістю 100 мл, розчинити у невеликій кількості дистильованій воді, перемішати, довести об'єм розчину до мітки.

ХІД ВИКОНАННЯ

- 1) Гостра інтоксикація - морським свинкам ввести в шлунок 3% водний розчин фториду натрію із розрахунку 250 мг на кг маси тіла; через 2-3 год хв різко збільшується процент перекисного гемолізу.
- 2) Підгостра інтоксикація - тваринам на протязі 10 діб внутрішньочеревно вводити 3% водний розчин фториду натрію в дозі 100 мг на кг маси тіла на добу; як і в першому випадку 50% летальність тварин пов'язана з гальмуванням цитохромоксидази.
- 3) Мала інтоксикація - тваринам на протязі 10 діб ввести у шлунок у вигляді 1% водного розчину фториду натрію у дозі 10 мг на кг маси тіла на добу; розвивається синдром пероксидації та гіперглікемія.
- 4) Хронічна інтоксикація - тваринам з їжею ввести на протязі 10 діб 1% водний розчин фториду натрію із розрахунку 25 мг на кг маси тіла на добу; розвивається гіперхолестеринемія.

Примітка. Контроль інтоксикації, крім указаних показників, можна також вести по вмісту фтору у сечі або по змінам забарвлення зубів.

Література: 1. Авцын А.П., Жаворонков А.А. Патология флюороза. Новосибирск: Наука.-1982. - 206 с. - 2. Фтор. Проблеми екології, біології, медицини та гігієни. Матеріали науково-практичної конференції, Полтава. - 1993. - 43 с.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВІДТВОРЕННЯ БЕЗАНТИОКСИДАНТНОГО РАЦІОНУ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Важливіші антиоксиданти є есенціальними компонентами харчування - вітаміни Е, С, Р. Недостача цих речовин при наявності всіх інших призводить до розвитку синдрому пероксидації та вільнорадикальної патології. В безантиоксидантній дієті немає вітамінів Е, С, Р, маценона, ненасичених жирних кислот, але є дріжджі, що містять вітаміни групи В.

Приготувати сольову суміш:

1. Кальцію карбонат двозаміщений 126,2 г
2. Калію фосфат двозаміщений 75,8 г
3. Натрію фосфат двозаміщений 61,4 г
4. Кальцію фосфат тризаміщений 117,8 г
5. Натрію хлорид 74,1 г
6. Магнію сульфат 27,8 г
7. Заліза (+2) сульфат 2,1 г
8. Марганцю сульфат 3,5 г
9. Калію йодид 0,3 г
10. Цинку карбонат 0,2 г
11. Міді сульфат 0,2 г

Після екстрагування розчинниками овес висушити добу. Висушений овес дуже ретельно перемішати, додаючи мінімальну кількість води. Цю суміш брикети та випекти в сухожаровій шафі при температурі 130°C. Брикети подрібнити та погодувати тварин - білих шурів та кроликів. У свинок синтезується аскорбінова кислота, на протязі 100-150 діб та морських свинок, у яких не синтезується аскорбінова кислота, на протязі 75-100 діб, але зі збільшенням строку збільшується рівень летальності. Крім цього цього корму тварини не отримують інших кормів.

Примітка. Антиоксидантна недостатність контролюється по рівню перекисного гемолізу еритроцитів, дієнових кон'югатів і малянового диальдегіду крові, а також по вмісту антиоксидантів та активності антиоксидантних ферментів. У морських свинок, які споживали безантиоксидантний раціон, вже на 25 день підвищується рівень диальдегіду вибуху нейтрофілів крові (О.И. Цебржинский). Вперше діста опубліковано О.Н. Воскресенським і В.В. Виттом (1971).

Література: 1. Бобырев В.Н. Влияние препаратов биоантиоксидантов на развитие экспериментального перекисного атероартериосклероза / Автореф. дисс. канд. биол. наук. - М., - 1981. - 2. Воскресенский О.Н, Туманов В.А. Антипротекторы. - К. - 1982. - 153 с. - 3. Воскресенский О.Н, Витт В.В. Изменения в артериальной стенке кроликов при длительном кормлении их нативным и окисленным жиром // Артериальная патология. - 1971. - №6. - С. 51-55. - 4. Цебржинский О.И. Влияние фторидов на окислительные процессы свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма животных и человека / Автореф. дисс. канд. биол. наук. - Симферополь. - 1991.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВІДТВОРЕННЯ ХОЛЕСТЕРИНОВОЇ ДІЄТИ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

В 1913 р. Н.Н. Анічков запропонував холестеринову дієту для дослідження атеросклерозу. Послідовними працями встановлено, що надлишок

2. Потім бюкси з кришками помістити в ексикатор, на дно якого вилити 10 мл концентрованої сірчаної кислоти, охудити.
3. Після охолодження бюкси закрити і зважити на аналітичних терезах з точністю до $\pm 0,001$ мг.
4. Пробу тканини швидко помістити в бюкси, закрити і зважити. Отримати масу бюкса з масою свіжої тканини.
5. Відкритий бюкс з тканиною висушити в сушильній шафі при температурі 100°C на протязі 1 год., охолодити в ексикаторі і зважити.
6. Повторити висушування і зважування до отримання постійної ваги.

Значення цих показників дозволяє визначити масу свіжої та висушеної тканини (сухий залишок) і масу води, вирахувати показники густоти та початковий об'єм води в зразках тканини на 1 г сухого залишку (г/г).

Література: Гарєєв Р.А., Беклемішев І.Б., Мурзамадієва А.А. Методы исследования гематолимфатического обмена / Алма-Ата, «Гылым», 1991.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ ЕФЕКТИВНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ РАН, ЯКІ ЗАГОЮЮТЬСЯ ВТОРИННИМ НАТЯЖІННЯМ ПРИНЦИП МЕТОДУ

Характер і темп загоювання відкритих площинних ран можна оцінювати реєструючи швидкість зменшення пораненої поверхні в площі (планіметрія). Результати повторних вимірів площі ран характеризують динаміку регенеративних процесів не тільки епітелію, який покриває рану, але й грануляційної тканини, що підлягає.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Товста поліетиленова плівка
2. Кулькова ручка
3. Ножиці, ТУ 64-1-64-78
4. Терези лабораторні ВЛР-200, ГОСТ 19491-74.

ХІД ВИКОНАННЯ

1. На рану накласти лист поліетилену і на ньому нанести контур рани.
2. Ножицями старанно вирізати обмальовану ділянку.
3. Зважити на лабораторних терезах обмальовану ділянку, вагу вирашити в грам.
4. Одночасно зважити еталон площі.
5. Підрахувати процент зменшення рани за добу по відношенню до площі, яку вираховували при попередньому вимірюванні:

$$\% = \frac{(S - S_n) \times 100}{S_t}, \text{ де}$$

S - площа рани при попередньому вимірюванні,

РОЗДІЛ 8. МЕТОДИ ПРОВЕДЕННЯ ТОКСИКОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИВЧЕННЯ ЕМБРІОТОКСИЧНОЇ ДІЇ

ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

1.1. Під ембріотоксичними властивостями розуміють здатність якоїсь іншої з речовин виявляти токсичну дію на розвиток зародка. Ембріотоксичність може проявитися як у збільшенні рівня ембріональної смертності (ембріональна дія), так і у вигляді анатомічних, гістологічних, шкідливих біохімічних, нейрофізіологічних та інших відхилень від норми, що проявляються до чи після народження (тератогенна дія). Крім відхилення від нормального стану у потомства може проявитися зменшення маси тіла, краніокаудального розміру плодів, затримки осифікації скелету (загальна затримка розвитку).

1.2. Дослідження проводити для того, щоб в'ясувати чи впливає фармакологічна речовина ембріотоксичними властивостями і в яких умовах (діапазон доз, тривалість дії та інше) виявляються ці властивості.

1.3. Дослідження на наявність ембріотоксичних властивостей повинні проходити всі нові фармакологічні речовини, які можуть бути призначені жінкам, які знаходяться в репродуктивному періоді життя, а також ті, що не випробувані в медичній практиці сполуки, які в ролі допоміжних речовин включаються в лікарську форму нових засобів чи тих, що вже застосовуються. Виключення може бути зроблене для протипухлинних засобів, якщо їх застосування обмежуються тільки в онкологічній практиці.

1.4. Експериментальні дослідження повинні включати як вивчення стану потомства в кінці антенатального періоду розвитку (1 етап дослідження), так і вивчення стану потомства в постнатальному періоді життя (2 етап дослідження). Обмеження досліджень 1 етапом можливо тільки в тих випадках, коли шкідливість може бути віднесений до сильних чи дуже сильних тератогенів.

1.5. До моменту початку тестування необхідно мати інформацію про фізико-хімічні властивості речовини; склад готової лікарської форми препарату; дози (смертельна, ефективна, яка рекомендується в клінічних випробувань); ознаки інтоксикації, специфічні для даної речовини; шляхи введення, що рекомендуються; профіль фармакокінетики дії; показання і схеми застосування препаратів в клініці. Бажано також мати дані про фармакокінетику фармакологічної речовини.

1.6. Вивченню підлягає субстанція фармакологічної речовини. При комбінації декількох фармакологічних чи лікарських речовин в одній

2. ТЕСТУВАННЯ НА ЩУРАХ (1 ЕТАП ДОСЛІДЖЕННЯ)

2.1. В кожній групі щурів, як у досліді, так і в контролі, повинно бути не менше, як 20 вагітних тварин. Випадки стерильного спарювання не входять. Першим днем вагітності є день, коли сперматозоїди виявляються у вагінальному мазку.

2.2. Речовину, яка тестується, вводити самкам один раз на добу, бажано один і той же час. Досить оптимальною є наступна схема введення препарату: різним групам тварин вводити препарат з 1 по 6, 7 по 10, 11 по 16 по 19 дні вагітності. Речовину, що вивчається, вводити з 6 по 10 днів вагітності у 3-х дозах (п.1.9.), а інші строки - у вищій дозі. Якщо при введенні речовини у вищій дозі відмічається ембріотоксичний ефект, проводити додаткові дослідження для встановлення порогової дози, використовуючи проміжну і ефективну дозу. Якщо по технічним причинам неможливо ввести речовину у вказані строки, наприклад, при внутрішньовенному введенні, експериментатор може скористатися другою схемою введення, передбаченою 3-х або 4-х денним безперервним введенням речовини, враховуючи при цьому умови, передбачені в п. 1.8. Щури контрольної групи в ці строки потрібно вводити розчинник, використаний при приготуванні розчину або суспензії речовини, яка тестується. Крім того, повинна бути група інтактних тварин самок. В деяких випадках, на погляд дослідника, доцільно використання порівняльного контролю, тобто тварин, яким вводять вже застосований у клінічній практиці препарат, близький до того, що вивчається по хімічній структурі або аналогічний по фармакологічній дії. Для оцінки реактивності дослідних тварин можна використовувати позитивний контроль, тобто тварин, яким вводять, наприклад, певний сталонний тератоген (саліциловокислий натрій, циклофосфамід та інше) у дозі, яка виявляє ефект приблизно на 50 відсотків зародків.

2.3. У самок, яких використовують в експерименті, необхідно спочатку визначити естральний цикл. На протязі експерименту слід спостерігати за станом і поведінкою вагітних самок, регулярно зважувати тварин і виявляти можливі токсичну дію дослідної речовини. У дослідах необхідно використовувати віргінних самок, лінійних, гібридних або рандомбредних тварин.

3. ОЦІНКА РЕЗУЛЬТАТІВ НА 1 ЕТАПІ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1. Результати оцінювати після евантазації і розтину самок. Розтин самок проводити на 20 день вагітності.

3.2. Показниками ембріотоксичності є: пред- і постімплантаційна ембріональна смертність, морфологічні (анатомічні) вади розвитку, а також загальна затримка розвитку плода. Предімплантаційну смертність виявляти по різниці між кількістю жовтих тіл у яєчниках і кількістю мортимплантацій в матці; постімплантаційну смертність - по різниці між

Для перевірки чутливості та інформативності тестів, що використовувались, доцільно мати дані, отримані з еталонними зразками, наприклад, амфетаміном, метилоксиметанолом та іншими. Необхідно також на увазі, що введення деяких речовин у час вагітності може несприятливо впливати на поведінку самок, приводячи до порушень лактації, втрати материнських інстинктів та інше. В зв'язку з цим, у ряді випадків може виникнути необхідність перехресного вигодовування потомства.

4.4. У потомства в постнатальному періоді життя може також відбуватися порушення окремих функцій печінки, ендокринної та імунної систем та інше. Питання про те, вивчення яких органів, систем і функцій необхідно проводити, окрім тих вищевказаних дослідів, вирішується експериментатором з урахуванням фармакологічних і токсикологічних властивостей досліджуваної речовини, а також результатів I етапу дослідів. Методи, застосовані на I етапі проведення цих дослідів аналогічно використовують у токсикологічних дослідженнях.

4.5. При статистичній обробці отриманих результатів, у вигляді небажаної змінної використовувати середнє значення відповідного показника за кожним окремим послідом.

В зв'язку з цим, при формуванні груп для окремих серій дослідів бажано, щоб додержувалось рівне представництво від кожного пошкодження. При цьому необхідно передбачити можливість роздільного аналізу результатів для самок і самців. У звіті повинні бути представлені дані про використані методи статистичного аналізу.

5. ТЕСТУВАННЯ НА КРОЛЯХ

5.1. Дослідження проводити на вірогідних самках. Кожна група (включно з контролем) повинна складатися не менш, ніж з 12 вагітних кролиць.

5.2. Речовину, що вивчається, рекомендується вводити з 6 по 18 дні вагітності один раз на добу, у вищій дозі (п.1.9). Групи контрольних тварин повинні бути такими, як обумовлено в п.2.2. Питання про те, що доцільно використовувати субстанцію чи лікарську форму, вирішується так, як обумовлено п.1.6. При появі труднощів, що заважають тривалому введенню речовини, можна змінити схему введення і вводити препарат 3-5 днів підряд. При цьому слід збільшувати кількість груп тварин, щоб охопити весь указаний вище строк вагітності.

5.3. Результати оцінювати після евантазії і розтину самок. Можливо вдаватись до хірургічного вимання плодів у живих кролиць.

5.4. Показниками ембріотоксичності є показники, що і у щурів на I етапі дослідів (3.2). Статистичну обробку результатів проводити так, як обумовлено в п.3.3.

6. ВИВЧЕННЯ ПОШКОДЖУЮЧОЇ ДІЇ ФАРМАКОЛОГІЧНИХ РЕЧОВИН НА РЕПРОДУКТИВНУ ФУНКЦІЮ

6.1. Фармакологічні речовини можуть впливати на репродуктивну функцію, що викликає не тільки виродження або загибель ембріонів

но, але й порушує гаметогенез і перешкоджає заплідненню. Тому, оцінці фармакологічних впливів речовин у рамках вивчення їх безпеки, необхідно досліджувати вплив їх на репродуктивну функцію у модельних тваринах на самках і самцях, піддаючи дії препарату до схрещення.

Вивчення повинні підлягати всі фармакологічні речовини, а також сумішки, про які йшла мова в п. 1.3. Виключення може бути зроблено для нетоксичних препаратів, якщо їх застосування обмежується зоологічною практикою.

Положення, висловлені в п.п. 1.5., 1.6., 1.7. повинні виконуватись при оцінці впливу фармакологічних речовин на репродуктивну функцію.

7. ОСНОВНІ ПРАВИЛА ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ФАРМАКОЛОГІЧНИХ РЕЧОВИН НА РЕПРОДУКТИВНУ ФУНКЦІЮ

1. Досліди проводити на лінійних, гібридних або рандомбредних щурах. Речовину досліджувати в 3-х дозах (п.1.9.). Самцям препарат вводити протягом 60-70 днів, самкам - 15-30 днів. Потім тварин парувати з невідомими самками і самцями. Рекомендується мати у кожній групі до моменту парування не менш 20 самців і самок - 40, у яких перед початком циклу перевірені естральний цикл. Самок підсадити до самців у стадії проеструсу в співвідношенні 2:1, строком на 2 естральних цикла. Зпліднення реєструють за допомогою вагінальних мазків. Половина підсаджених самок підлягала евтаназії на 17-21 день вагітності, на розтині врахувати кількість жовтих тіл у яєчниках, місце імплантації у матці і кількість живих і померлих плодів. На основі цих даних виявити рівень пре- і постімплантаційної смертності зародків. Крім того, для оцінки плодовитості враховувати індекс плодовитості та індекс вагітності.

$$\text{індекс плодовитості} = \frac{\text{число запліднених самок}}{\text{число самок, висаджених з самцями}}$$

$$\text{індекс вагітності} = \frac{\text{число вагітних самок}}{\text{число запліднених самок}}$$

Половину самок залишити до пологів і спостерігати за фізичним розвитком потомства до закінчення періоду вигодовування.

2. Необхідно мати на увазі, що пригнічення репродуктивної функції при тривалому введенні деяких фармакологічних речовин може бути обумовлено не тільки порушенням гаметогенезу, але й багатьма іншими причинами (зміна ендокринної функції статевих залоз, гіпофізу,

наднирників, гіпоталамусу, деяких центрів головного мозку та інших. Тому, якщо під впливом речовини, що тестується, виникають порушення плодовитості тварин, необхідно виявити, чи залежить це від порушення спермато- або овогенезу, чи від інших причин, вживаючи для цього методи виявлення шкідливої дії хімічних сполук на спермато- та овогенез. Для конкретних методів досліджень проводиться експериментатором. Деякі методи, що найчастіше використовуються, приведено у додатку.

8. СХЕМА ОБЛІКУ РЕЗУЛЬТАТІВ ВИВЧЕННЯ ЕМБРІОТОКСИЧНИХ ЯВИЩ І ВПЛИВУ НА РЕПРОДУКТИВНУ ФУНКЦІЮ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ РЕЧОВИНИ

8.1. Представлений у фармакологічній комітет МОЗ має обов'язково вміщувати цифрові дані у формі таблиць, що вміщують основні дані, необхідні для виявлення наявності або відсутності ембріотоксичних властивостей препарату, що досліджується і його вплив на репродуктивну функцію. Форма деяких таблиць представлена у Додатку.

8.2. При описуванні аномалій розвитку слід керуватися загальноприйнятими термінологією. Якщо важко описати яку-небудь з аномалій розвитку, слід представити фотокартку плода з цією аномалією.

8.3. У заключній частині звіту необхідно дати оцінку результатів дослідження по наступним напрямкам:

- оцінка результатів, отриманих при обстеженні потомства в антенатальному періоді розвитку (1 етап дослідів);
- оцінка результатів, отриманих при обстеженні потомства в постнатальному періоді розвитку (2 етап дослідів);
- оцінка результатів, отриманих при вивченні впливу препарату на репродуктивну функцію.

При оцінці результатів, отриманих на I етапі у дослідях на особинах можна використовувати приведену нижче «Схему оцінки вираженості ембріотоксичної дії фармакологічних речовин». У даній схемі критеріями, за допомогою яких оцінюють ступінь ембріотоксичності є:

1. Характер відмічених порушень.
2. Величина дози, при якій відмічається ефект.
3. Статистична значимість отриманого результату по відношенню до паралельного контролю і відношення цього результату до «загального» контролю лабораторії. Ступінь виразності ефекту визначається сполученням всіх трьох критеріїв.

Не розглядаючи всіх випадків, які можуть виникнути при аналізі результатів за допомогою цієї схеми слід відмітити, що в більшості випадків, при яких величина того чи іншого показника у досліджуваній контрольних тваринах буде близькою до «максимальної» у «загальному» контролі, для кінцевого висновку можуть знадобитися додаткові дослідження.

ною метою яких буде уточнення отриманого раніше результату, і це проводиться при плануванні строків проведення експерименту по відношенню ембріотоксичних явищ фармакологічних речовин.

СХЕМА ОЦІНКИ ВИРАЖЕНОСТІ ЕМБРІОТОКСИЧНОЇ ДІЇ

Характер порушень	Величина порогової дози	Статистична значимість результату по відношенню до паралельного контролю та його співвідношення до загального контролю
1	2	3
	T-терапевтична чи близька до неї	1. Статистично значимо, перевищує максимальний рівень "загального" контролю 2. Статистично значимо, але перевищує максимальний рівень "загального" контролю
не більш 0,01% (Наприклад, мінорактизм, есентрація, фокомеліофталмія, розширення гнечного піднебіння та інше). Ембріоморфність може скласти 100%.		рівень "загального" контролю
можливі або одичні аномалії з важкою поразкою окремих органів. Рівень спонтанного виникнення вищує 0,01%. (Наприклад, гідророз, крипторхізм, гідроцефалія тощо). Затримка у розвитку плодів швидше маси тіла, затримка процесу осифікації скелету). Гематоми вряк підшкірної клітковини, міонегальність.	B – вища, або близька до неї	3. Статистично значимо, але не перевищує максимальний рівень "загального" контролю. 4. Статистично не значимо, не перевищує максимальний рівень "загального" контролю

СТУПІНЬ ВИРАЖЕНОСТІ ЕМБРІОТОКСИЧНОГО ЕФЕКТУ

Дуже сильний	Сильний	Середній	Слабий	Відсутній
A1	AB1 BT1	AB2 BV	BV2 AB4	BV3 BV4

Примітка: 1. Сполучення A3 неможливо при звичайному використанні кількості вагітних самок у групі (20). 2. Сполучення T2, T3, T4 не глядається, так як дослідні починають, використовуючи вищу дозу і ці дослідні будуть мати місце сполучення B2, B3, B4.3. Сполучення A4 можливо по тій причині, що і A3, але представлено у схемі для позначення ефекту, при якому у повторних дослідних розміщений спонтанний характер ефекту ви у дослідних групах одичних плодів з аномаліями типа A.

1. ОСНОВНІ МЕТОДИКИ, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ В ЕКСПЕРИМЕНТІ ПРИ ВИВЧЕННІ ЕМБРІОТОКСИЧНИХ ВПЛИВІВ ФАРМАКОЛОГІЧНИХ СПОЛУК**1.1. ЕВТАНАЗІЯ ПІДДОСЛІДНИХ ТВАРИН І ОТРИМАННЯ ЕМБРІОНАЛЬНОГО МАТЕРІАЛУ**

Евтаназію самок здійснювати дислокацією шийних хребців. Різати черевну порожнину, вирізати матку, перенести у чашку Петрі фізіологічним розчином, розітнути роги матки, підрахувати кількість живих, мертвих і резорбованих плодів. Вийняти плоди, звільнити їх від оболонок, перенести у чашку Петрі з фізіологічним розчином. Вважати підрахувати кількість жовтих тіл вагітності.

1.2. ЗОВНІШНІЙ ОГЛЯД, ЗВАЖУВАННЯ ПЛОДІВ

Усі живі плоди кожного посліду обстежити під бінокулярним мікроскопом моделі МБС для виявлення зовнішньо видимих аномалій розвитку. Після цього плоди слід зважити. У журналі відмітити стан кожного плоду, описати аномалії, вказуючи вагу кожного плоду і сумарну вагу плодів посліду.

Після зовнішнього огляду плодів, ресстрації всіх виявлених аномалій розвитку і зважування, плоди кожного виводку поділити на 2 групи. Одну групу плодів (1/3) зафіксувати в рідині Буена і використати для вивчення внутрішніх органів. Другу групу плодів зафіксувати у 96% розчині спирту і використати для вивчення стану скелету (2/3).

1.3. ДОСЛІДЖЕННЯ ВНУТРІШНІХ ОРГАНІВ ПО МЕТОДУ ШІНДІЗМА В МОДИФІКАЦІЇ ВІДДІЛУ ЕМБРІОЛОГІЇ НДІЗМ АМН СРСР

Досліди проводять на плодах, які фіксувались у рідині Буена не менше 12 годин. Плід закріплювати на пробковому столику і за допомогою безперервної бритви розрізом паралельно нижній щелепі відділити голову від тулуба. Перший розтин проводити перпендикулярно нижній щелепі відпрацювавши вібрисами. На цьому зрізі видно стан нижньої щелепи, переднього надчерепа, твердого піднебіння і носової порожнини. Другий розтин проводити через середину очних яблук і захватити нюхові луковичі. На третьому розрізі видно стан головного мозку (кори великих півкуль, бокових, третього і четвертого шлуночків). Зріз проводити через великий поперечний діаметр черепної коробки. Четвертий розріз провести паралельно третьому. Досліджувати мозочковий, продовгуватий мозок. П'ятий розріз провести через гортань стравохід, спинний мозок, судини, слинні залози. Шостим розрізом відсікти шию від голови до тулубу. Розріз проводити перед передніми лапами. Видно стравохід, трахею, спинний мозок, великі судини і бронхи. Восьмий розріз проводити по середній лінії між шостим розрізом і пупковим кільцем. Роздвигється печінку, а потім обхрипавши виийняти її пінцетом і дослідити стан діафрагми. Дев'ятий розріз проводити нижче пупкового кільця. На цьому розрізі видно печінку, кишечник

шлункову залозу. Обережно виїнявши петлі кишечника і печінку і можна зберігати органи тазу, сечоводні, сечовий міхур, пряму кишку, внутрішні статеві органи. Необхідно звернути увагу на нирки (можливий гідронефроз) і яєчка з придатками або тестикули з придатками.

1.4. МЕТОДИКА ФАРБУВАННЯ ПЛОДІВ ПО ПЕТЕРСУ

Ця методика дає можливість бачити більш тонкі порушення структур, ніж у незабарвлених препаратах. Зрізи, зроблені по Вільсону, промити 10 хв у дистильованій воді, щоб видалити з поверхні залишки фіксатору. Ці зрізи помістити у розчин оцтовокислого крезилвіолета на 10 хв. Підготувати розчин: оцтовокислий крезилвіолет розчинити у дистильованій воді до концентрації 0,1%. Перед використанням, для досягнення оптимального фарбування, у основний розчин додати 2% оцтову кислоту до отримання рН приблизно 1:20). Зрізи в розчині періодично переключати з одного боку на інший. Промити у дистильованій воді і дослідити під мікроскопом моделі (С). Після дослідів зрізи можна зберігати у 70% розчині етанолу. При необхідності із забарвлених зрізів можна виготовити гістологічні препарати. Результати фарбування: кістка - фіолетова, хрящ - світло-червоний, залюзиста тканина - темно-блакитна, інші тканини - жовті, зелені, блакитні.

1.5. МЕТОД ВІСЦЕРАЛЬНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ ОРГАНІВ ПЛОДІВ ПО СТЕЙПЛЕСУ

Після зовнішнього огляду плоду на наявність зовнішніх аномалій розвитку, вимірювання ваги і краніокаудального розміру, провести декапітацію і голову фіксувати у рідині Буена для послідовного вивчення по методиці Вільсона. Капітовану під зафіксувати, очними ножицями розрізати передню черевну кишку і груди (впродовж лівого краю грудини). Пінцетом виїняти виличкову кишку і дослідити топографію і стан великих судин, які відходять від серця (права та ліва підключичні артерії, загальна сонна артерія, висхідна, нисхідна, легенева артерія). Звернути увагу на їх форму і розміри. Пінцетом фіксувати серце за вушко правого передсердя, розсікають ножицями серце двома розрізами від верхівки до основи (1 - правіше, 2 - лівіше міжшлункової перегородки) і дослідити стан міжшлункової перегородки і клапанів. Потім дослідити стан легень (кількість долей), органів черевної порожнини. Після виявлення пінцетом печінки визначити стан діафрагми, а виїнявши петлі кишечника, оглянути надширшкки, нирки, сечопровідники, сечовий міхур. Нирки розрізати на рівні ниркових лоханок і дослідити їх. Виявити статі плоду і визначити топографію статевих органів. Потім плоди зафіксувати у 95% розчині етанолу для подальшого вивчення стану їх скелету по методу Доусона.

1.6. ФАРБУВАННЯ СКЕЛЕТУ АЛІЗАРІНОМ (методика Доусона, модифікована у відділі ембріології НІДЗМ АМН СРСР).

Плоди зафіксувати у 96^о етанолі не менше 7 днів. Бажано, щоб кількість циркулярної була більшою об'єму плодів, що підлягають фіксації, не менш ніж у 10

разів. Періодично (мінімум 2 рази) необхідно міняти сполучні трубки, у яких після фіксації в етанолі вибрані внутрішні органи, занурити в 1% розчин гідроксиду калію для просвітлення м'яких тканин. Час накопичення в цьому розчині визначають емпірично (приблизно 1-2 діб). Кожні п'ять днів закладки кісток, плоди виїняти, промити водопровідною теплою водою, розчин А (150 мл гліцерину, 300 мл дистильованої води і 10 г гідроксиду калію) до нього додати червоного алізарину (до появи світло-фіолетового кольору). Через 3-5 діб задубівши ділянки скелету фарбувати у червоно-фіолетовий колір. Для знебарвлення м'яких тканин плоди перенести у розчин А на 7-14 днів. Потім їх слід зневоднити шляхом повільного промивання суміш гліцерину, спирту і води у різних пропорціях (1:2:7; 2:2:6; 1:1:3) з частини спирту і гліцерину, чистий гліцерин, до якого додають 1-2 краплі формаліну (у чистому гліцерині плоди можуть зберігатися). Плоди розглянути під мікроскопом моделі МБС. Підрахувати плоди з аномальною кількістю плодів, у яких відсутні ті чи інші кістки.

1.7. ПОДВІЙНЕ ФАРБУВАННЯ ПЛОДІВ НА КІСТКИ І ХРЯЦІ ПО ПЕТЕРСУ

Після 7-денної фіксації плодів, у яких видалені нутрощі, у 96% етанолі перенести у спиртовий розчин алізаринового блакитного. Забарвлення досягається через 2-3 дня. Розчин складається з наступних компонентів: етиловий спирт 96% - 80 мл, льодяна оцтова кислота - 20 мл, алізарин блакитний - 15 мл. Розчин необхідно міняти кожен день. Після фарбування проводити зневоднення плодів у абсолютному спирті на протязі 3 днів. Необхідно періодично освітлювати спирт. Потім плоди фарбувати 0,5% алізарином, (розчиненим у 1% гідроксиду калію) на протязі 2-5 діб. Плоди провести по розчинам гліцерину зростаючої міцності - 25%, 50% і 80%.

Перебування плодів у кожному розчині - 1 день.

Плоди зберігати у чистому гліцерині.

Результати фарбування: кістка - червона, хрящ - блакитний.

1.8. МЕТОДИ ВИВЧЕННЯ ПОТОМСТВА У ПОСТНАТАЛЬНОМУ ПЕРІОДІ ЖИТТЯ

Загальні спостереження за фізичним розвитком потомства:

Дні спостереження	Параметри, що реєструються
1 - 2	Розмір посліду, число живих і мертвих новонароджених, чини різної статі. Вираховувати розмір посліду і індекс загибелі.
4, 7, 14, 21 з 2	Загибель новонароджених, вага тіла, підліпання вушної раковини (середньому - 2 день)
з 4	Поява перинного волосяного покрыву (в середньому - 5 день)
з 6	Прорізування різців (в середньому 8 день)
з 12	відкриття очей (в середньому 14 день)
з 23	опущення сім'яників (в середньому 23 день)
з 28	відкриття ліхви (в середньому 30 день)

Виміщення швидкості дозрівання сенсорно-рухальних рефлексів
у період вигодовування

№	Показники	Спосіб проведення дослідження і параметри, що реєструються
1	2	3
1	нерезерганія на поверхні	Шурят покласти на стіну на плоску поверхню і швидко відпустити і замірити час, необхідний для повернення у нормальне положення. Формування рефлексу вважається завершеним (у середньому на 8 день), якщо шурята повертаються на всі 4 лапи. Дослід проводити не більше ніж по 30 сек з можливо тваринною до повного формування рефлексу у всіх контрольних послідах.
2	негативної геотаксис	Дослід проводити 1 раз на день, по 1 хв. Шурят помістити на похилу поверхню (25°) головою вниз. Рефлекс вважається сформованим, якщо шурята повертаються на 180° (в середньому на 7-й день). Можливо заміряти час утримання на плоскості. Дослід проводити до повного формування рефлексу у всіх контрольних послідах.
3	уникнення відриву	Шурят покласти на стіл або підняту над кліткою платформу таким чином, що передні лапи дістають до краю столу. Формування рефлексу завершено, (у середньому 9-й день), якщо на протязі 10 сек. шурята відповзають від краю платформи. Дослід проводити до повного формування рефлексу у всіх контрольних послідах.
4	малтинковий рефлекс	Виявити як зміну повороту голови і тулубу в горизонтальній площині і приблизно на 90 градусів за рахунок переміщення передніх лап, кови задні лапи підняті і нерухомі. Замірити кількість поворотів за 1 хв. і кількість змін повороту на зворотні (реверсія).
5 - 9 10 - 11 13 - 15 17 - 20	Відкрите поле	Шурят помістити на платформу, розміром 30 x 20, на якій проведено лінії, що утворюють 36 квадратів. Реєструвати: підняття голови та передніх лап; повзання; опору на задні кінцівки, підняття всього тіла; рухальну активність (число пересічених квадратів), омивання різного роду, обнювання, сльиви, карабкання на стінки, стрибки, час відсутності активності, можливі аномалії ходи.
18	Реакція на акустичний стимул	Шурят помістити на певелику площину у звукоізоляованій клітці. Поворот шиюладки або рух тварини можна реєструвати автоматично або візуально. Рефлекс вважається сформованим, якщо тварина реагує на акустичний стимул довжиною 0,3-0,5 сек. (в середньому формується на 13 день. Дослід проводити повного формування рефлексу у всіх контрольних послідах.
3	Зіничний рефлекс	Реєструвати скорочення зіничі або поворот голови. Дослід проводити у затемненому приміщенні є крапковим джерелом світла до повного формування рефлексу у всіх контрольних послідах (в середньому - 14-15 день).
14-15	Уникнення обриву	Тварину помістити на площину, підняту на висоту 45 см на поверхню. Уникнення падіння вважається позитивним рішенням. Дослід проводити одноразово, після відкриття очей.
10-11	Реакція нюху	Тварину помістити посередній рейки, ширинкою 6 см з ділянками, яку кладуть на клітки. Відстань між клітками можна міняти. Визначити відстань на якій тварина вірно вибирає навіршок на клітку з сибсами і матір'ю, в якій вона була до дослідження. Середній термін формування рефлексу 10-11 день. Можна враховувати число надій, сковань, суміщючі цей тест з тестом ходіння по рейці.
3	М'язова сила	Тварину помістити на тушту дротяну сітку, яку повинно повертатися на 180 градусів. Вимірювати час знаходження тварини під сіткою, яка повинна влітти на сітку не менш ніж 15 сек. Дослідження провести до досягнення критерію усіма контрольними послідами.

**Дослідження емоційно-рухової поведінки і здібності до
координації руху**

Дні спостереження	Показники	Спосіб проведення дослідження і методи реєстрування
1	2	3
17-20	Перевертання у повітрі	Щурят тримати спиною вниз на шпильці м'якою поверхнею і швидко опустити. Реєструвати, чи перевертаються щурята і щоб впасти на всі 4 лапи
14-25	Утримання на циліндрі, що обертається об/хв.)	Вивчити час утримання на циліндрі, що обертається (при швидкості 30 об/хв.) Дослідження проводити до досягнення критерію утримання на протязі 3 хв на циліндрі, що обертається поверхнею діаметром близько 12 см. Складати задачі можна змінювати, зменшуючи висоту циліндра і його текстуру, а також швидкість обертів. Дослідження проводити до досягнення критерію всіма контрольними тваринами
40-45	Відкрите поле	Дослідження проводити у 3-х хвилинах протязі 3-4 днів, або при великій кількості тварин (більш 60) один день при тривалості не більше 3-х хвилин. Щурів помістити у центрі яскраво освітленої площини, розділеної на квадрати. Реєструвати час виходу з центру (латентний період), число відвіданих квадратів (рухальна активність), число стійок, реакції озирання, число вмивань різного типу (тривало), число актів дефекації і уринації (сміливість)
30-45	Споитання рухальна активність	Вимірювання рухальної активності може бути проведено одним із альтернативних методів аналізу: "біляче колесо", систем з фотоелектронною і магнітною реєстрацією

Примітка: ці показники можна вивчати не у динаміці, а однією або передбачасмий день дозрівання рефлексу у контрольних тварин.

Вивчення навчасності та пам'яті

Засіб проведення експерименту	Параметри, що реєструються
Пасивне уникнення з негативним (больовим) підкріпленням	
Методика заснована на природній для щурів реакції, більшою частиною на прагненні переходити з освітленої камери в темну. Щурів помістити в освітлену камеру розміром 40x20 см. В 1-й день навчання тварини у темній камері отримують електробольове подразнення при силі струму 1 мА. Через 24,48 годин досліджувати час знаходження тварин в освітленій камері (звичайно не більш 2-3 хв)	Відносна кількість тварин, що не уникають світлої камери. Латентний період виходу в темну камеру на першому пред'явленні. Латентний період виходу в темну камеру через 24 години після навчання.

Засіб проведення експерименту	Параметри, що реєструються
<p>Активне уникнення з негативним (больовим) підкріпленням</p> <p>Активно звичайно у т.н. човникової камері, яка складається з двох відсіків, розмірами 20x20 см і з двома дверцятами. В підлозі камери встановлені лампи, на які можна подавати струм силою 0,75-1,0 В (звичайно визначати больовий поріг необхідно для кожної тварини і використовувати поріг рівний 1,5 больового порогу. (Навчання методом активного уникнення проб заключається в тому, що кожне впробування з сигналу (зумер, світло). Якщо тварина не фіксує певний час (5-10) не переходить у безпечний відсік і не подає електробольовий подразник. Дослідження продовжують до досягнення критерію навченості не менш ніж у 80% тварин контрольної групи. Критерієм навченості є 18 успішних уникнень в серії 20 дослідів. При навчанні двох-сторонньому уникненню. При досягненні довгострокової пам'яті (наприклад, 1,7,10 днів до досягнення критерію) тварини підлягають повторенню з навчанням випробуванням. Згасання навчання досліджувати щоденно, не підкріплюючи тварин больовим подразником. Можливі модифікації методу виробки цього рефаксу: одностороннє навчання, мисливське навчання.</p>	<p>підкріпленням</p> <p>Середня кількість правильних відповідей в залежності від числа пред'явлень. Крива навченості - відносна кількість тварин, що досягнули критерій навченості при даному числі випробувань. Середнє значення больового порогу. Середня кількість міжсигнальних реакцій. % помилкових відповідей при дослідженні пам'яті Швидкість згасання навичку</p>
<p>Навчання в лабіринті з позитивним (харчовим) підкріпленням</p> <p>Використовують Т-У-подібні лабіринти. Тварин навчають з початку обмеження в харчуванні, після чого протягом дня досліду і після досягнення критерію навченості, підібраного емпірично при аналізі кривої навченості. Дослідження продовжують до досягнення критерію не менш ніж у 80 % тварин контрольної групи. При відсутності різниці в швидкості навчання, досліджують пам'ять навчених тварин. При дослідженні пам'яті необхідно, щоб тварини отримали процесі навчання схожу кількість підкріплень.</p>	<p>підкріпленням</p> <p>Середня кількість правильних відповідей в залежності від числа пред'явлень. Крива навченості. Частота (тривалість) різних актів поведінки, в тому числі і емоційна реакція на лабіринт. Кількість різних елементарних актів поведінки до досягнення критерію навченості. Втрата маси тіла в процесі навчання і кореляція цього показника з швидкістю придбання навичку.</p>

Дослідження ембріотоксичної дії (найменування препарату) на (найменування виду тварин)

Показники	Групи тварин (дні введення препарату, доза)
<p>Кількість вагітних самок (о/о) Кількість жовтих тіл (о/о) Кількість місць імплантації (о/о) Кількість живих плодів (о/о) Кількість резорбцій (о/о) Передімплантаційна смертність (%) Постімплантаційна смертність (%) Маса плоду (г) Краніокаудальний розмір (мм) Зовнішній огляд плодів: кількість обстежених плодів - з них з аномаліями розвитку: абс./%</p>	<p>в чисельнику - загальна кількість, в знаменнику - на 1 самку</p>

Порушення розвитку, що відмічаються при дослідженні плодів (найменування виду тварин), отриманих від самок, яких вводили (найменування препарату).

Вид порушення	Група тварин / дні введення, доза	
	Кількість плодів, що мають порушення абс. % до загальної кількості обстежених по цій методиці плодів	

2. СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ВИВЧЕННЯ СПЕРМАТО- І ОВОГЕНЕЗУ

2.1. Якщо серед піддослідних тварин відмічаються багаторазові випадки стерильних спарювань, рекомендується виділити окрему групу самок (не менш 10-15) і обстежити цих самок через добу після спарювання. Якщо при розрізанні щурів в ампулярній частині яйцеводів будуть виявлені овулюючі яйцеклітини, необхідно визначити, чи були ці яйцеклітини запліднені. Для цього слід досліджувати при допомозі фазовоконтрастної мікроскопу тотальні препарати яйцеклітин після фіксації і забарвлення лакмоїди або орсеїні. На таких препаратах у незапліднених яйцях гарно видно групу метафазних локотичних хромосом, а у запліднених – два пронуклеусу.

2.2. Для морфологічного вивчення сім'яників їх фіксувати у розчині формаліну або рідині Карнуа, залити у парафін, приготувати поперечні зрізи товщиною 6-7 мкм, зафарбувати гематоксілін-еоїном.

Морфологічну оцінку стану сперматогенного епітелію проводять наступним кількісним показником:

а) індекс сперматогенезу = $EA/100$, де А - число стадій у кожному каналі, 100 - число підрахованих каналців. Індекс сперматогенезу підраховують по 4-х бальній шкалі, зафіксувати у каналці наявність сперматогонію, сперматоцитів 1 і 2 порядків, сперматід і сперматозоїдів;

б) середня кількість нормальних сперматогоній у кожному каналці (підраховують 20 каналців)

в) відносну кількість каналців з 12 стадією мейозу (метафаза 2-го дозрівання, підраховують у 100 каналцях).

Для дослідження функціонального стану сперматозоїдів використовують суспензію, отриману при поздовжньому розрізі придатку сім'яника. Методика стандартизована по кількості (2мл) фізіологічного розчину і періоду перемішування (2 хв.) при кімнатній температурі. Це дозволяє проводити оцінку функції сперматозоїдів по наступним показникам: характер продовження їх руху, відносно кількості патологічних форм сперматозоїдів, концентрація сперматозоїдів у хвостовій частині епідеїмісу. Можливе також визначення відносної кількості живих сперматозоїдів і їх резистентності до осмотичної і кислотної.

5. Циркуль
6. Лінійка
7. Циліндр мірний місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74
8. Піпетки скляні місткістю 2, 10 мл ГОСТ 20292-74
9. Стакани хімічні, ГОСТ 1770-74
10. Предметні скельця 76x26 товщиною 1-2 мм, ГОСТ 9289-59
11. Предметні стекла з лункою
12. Покривні стекла 20x20, 14x14, ГОСТ 6672-75
13. Медичні змішувачі, ТУ 64-2-51-70
14. Відрізки гумових трубок для гомогенізації
15. Годинникове скло
16. Мікроскоп стереоскопічний МБС-9, ТУ 3-3.1210-78
17. рН-метр-мілівольтметр, тип рН-150, ГОСТ 22261-82
18. Терези лабораторні електричні ВЛ Е -134, ГОСТ 24104-88
19. Камера Горяєва модель 851
20. Колби мірні місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74

РЕАКТИВИ

1. Формалін, ТУ 6-09-3011
2. Хлорид натрію, кваліфікація "ч", ТУ 6-09-5222-85
3. Гідрокарбонат натрію, кваліфікація "ч", ГОСТ 4256-82
4. Метилловий фіолетовий ("Сhemapol", Чехія)
5. Спирт етиловий 96°, ГОСТ 5962-67
6. Соляна кислота, кваліфікація "ч", ГОСТ 3118-77
7. Еозин, ТУ 6-09-183-75

РОЗЧИНИ

1. 0,9% розчин хлориду натрію: наважку хлориду натрію масою 0,9 г зважити з точністю до 0,005 г, кількісно перенести в мірну колбу місткістю 100 мл, розчинити в невеликій кількості дистильованої води, перемішати і довести об'єм до мітки дистильованою водою, перемішати.
2. Спеціальний розчин: наважку гідрокарбонату натрію масою 5,0 г перенести у мірну колбу місткістю 100 мл, розчинити у невеликій кількості дистильованої води, додати 1,0 мл формаліну та довести об'єм до мітки дистильованою водою, перемішати.
3. 0,5% розчин еозину: наважку еозину 500 мг розчинити в 100 мл дистильованої води.
4. 1% розчин метилового фіолетового: наважку метилового фіолетового масою 1 г розчинити у 100 мл дистильованої води.
5. Розчини хлориду натрію (2,8%, 3%, 3,2%, 3,4 - 5%, 6%): для приготування 2,8% розчину хлориду натрію наважку 2,8 г натрію хлориду внести в мірну колбу на 100 мл. Довести об'єм до мітки дистильованою водою. Аналогічно готувати другі концентрації розчинів хлориду натрію.

Розчин 0,1 н соляної кислоти (готувати із стандарт-титрів): В мірну колбу об'ємом 1000 мл перенести вміст ампули стандарт- титра соляної кислоти (1 н). Ампулу добре промити дистильованою водою, збираючи промивні води в мірну колбу. Вміст колби перемішати, долити розчин дистильованої води до мітки на колбі та ще раз добре перемішати. Розчин стійкий, зберігати у склянці з притертою пробкою при кімнатній температурі.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

В досліді використовувати статевозрілих щурів-самців вагою 160-200 г. Перед декапітацією кожен тварину зважити, вагу занести в первинну таблицю 1. Потім тварину декапітувати. Ножицями розкрити черевну порожнину. Пінцетом дістати правий і лівий сім'яники з придатками. Кожен сім'яник зважити на терезах. Вимірити за допомогою циркуля і мірки їх довжину. Дані також занести в таблицю 1.

Таблиця 1.

№ п/п	Вага щура	Вага сім'яників				Довжина сім'яників	
		Правий		лівий		Правий см	Лівий см
		г	коэф	г	коэф		

Коефіцієнт» в таблиці 1 - це відношення ваги органу сім'яника до ваги щирини, множене на 100. Сім'яники залити 10% розчином формаліну для морфологічних досліджень. Видалені придатки сім'яників (епідідімум) необхідно розрізати ножицями і обережно! (не допускаючи пошкодження епідідімумів) гомогенізувати відрізком гумової трубки. 1-й придаток гомогенізувати на годинниковому склі з 2 мл фізіологічного розчину на протязі 2 хв. 2-й придаток гомогенізувати в хімічному стакані з 10 мл фізіологічного розчину на протязі 10 хв.

Вивчення функціонального стану спермій включає:

- визначення рухомості сперматозоїдів;
- визначення концентрації сперматозоїдів;
- визначення відносної кількості живих сперматозоїдів і патологічних форм.

Ці визначення провести з сім'яниками, які суспендують на годинниковому склі на протязі 2 хв відповідно до методики визначення функціонального стану сперматозоїдів, що надається.

Визначення рухливості сперматозоїдів:

Краплю суспензії сперматозоїдів, отриману при поздовжньому розрізі придатку і дозованому пере-мішуванні з 2 мл фіз. розчину, помістити на предметне скло з лункою, яке помістити у вологу камеру (чашка Петрі). Камера повинна знаходитись при температурі 24°C в термостаті. Спостерігати інтервалом 30 хв. - 6 годин. Відмічати час повної зупинки руху.

День експерименту	Щоденна доза		Сумарна доза		Кількість тварин, які загинули	Примітки
	в частині ЛД 50	в мг/кг	в частині ЛД 50	в мг/кг		
1	2	3	4	5	6	7
1			0,1			
2			0,2			
3	0,1		0,3			
4			0,4			
5			0,55			
6			0,70			
7	0,15		0,85			
8			1,0			
9			1,22			
10			1,44			
11	0,22		1,66			
12			1,88			
13			2,22			
14	0,34		2,56			
15			2,90			
16			3,24			
17			3,74			
18			4,24			
19	0,5		4,74			
20			5,24			
21			5,99			
22			6,74			
23	0,75		7,49			
24			8,24			
25			9,36			
26			10,48			
27	1,12		11,60			
28			12,72			

Після закінчення 28 днів експерименту тварин, що залишилися живими, забиті і описані вище внутрішні органи піддати макро- і мікроскопічному обстеженню.

Облік результатів і їх інтерпретації:

Результати експерименту оцінювати, розраховуючи коефіцієнт кумуляції:

Коефіцієнт кумуляції = ЛД50 хрон.: ЛД50 гостр.

Коефіцієнт кумуляції потім оцінюють згідно класифікації Медведи Л (1968).

Література: 1. Lim R.K.S., Rink K.C. et al. A method for the evaluation of cumulation and by the determination of acute and subchronic median effective doses//Arch. Int. Pharmacol.-1961.-130, N 3-4.- P.336-353.

Індивідуальні культури рекомендується вести в плоскодонних пробірках розміром 25x100мм. Для невеликих масових культур можна використовувати такі самі пробірки. При постановці схрещувань підтримці спеціальних ліній необхідно використовувати віргінінських Віргінінських самок відібрати наступним чином: із культури відібрати мух, потім через 6 годин, на протязі яких виводяться нові мухи, відібрати самок. Наркотизовані мухи можуть прилипати до свіжого середовища, загинути, тому після огляду їх краще помістити на бокові стінки пробірок, а коли вони почнуть рухатись, пробірки ставити вертикально. Для лабораторного розведення в оптимальних умовах (температура 25°C, доброякісне поживне середовище, відсутність перенаселення) період розвитку дрозофіли від яйця до імаго приблизно 10 діб. В лабораторних умовах мух розводять на поживному середовищі. Відсаджувати мух треба через добу після приготування середовища. Для досліду потрібно 2 види дрозофіл: дика - Oregon-k, Conton-S або D-32 і Меллер-5-Ванс. Для препарату ввести в середовище із розрахунку на 1 мл середовища. Слід також потрібно орієнтовно визначити LD50 для дрозофіли - це буде максимальна доза що використовується в експерименті. У випадку відсутності мутагенного ефекту на вищій дозі експерименти можуть бути зупинені. Якщо на вищій дозі виявились статично значимі ефекти, експеримент повинен продовжуватись на дозах 1/2LD50 і LD min x LD50 це дози, при якій виліт мух складає приблизно 50% від контролю. Для препарату з низькою токсичністю, за максимальну дозу можна прийняти дозу LD10. Для визначення LD50 відсадити по одній парі мух лінії Or-k на середовище. Паралельно поставити контрольну серію. Через дві доби витряхнути батьків і ввести препарат. Після вилуплення мух підрахувати кількість і порівняти з контролем. Поставити по 3-5 пробірок на кожну дозу. Після визначення токсичності препарату, що досліджується, в стаканище відсадити по 1-2 пари мух лінії Or-k. Через 2 доби витряхнути батьків і ввести препарат. Після вилуплення нового покоління відібрати інскоополовавших самців і схрестити з віргінінськими самками лінії Меллер-5. Після виліту мух першого покоління (F1) гетерозиготні самки схрестити з самцями Меллер-5. Огляд культуральних пробірок в другому поколінні (F2) здійснити візуально. Загальна кількість культуральних пробірок в F2 визначає число проаналізованих X- хромосом самців, яких піддали дії препарату. °х повинно бути не менш 1000. Пробірки, в яких відсутні самці дикого типу, відмітити як «леталі».

Постановка паралельно протікаючих контролів обов'язкові.

Розрахунок. Частота рецесивних леталів оцінюється як кількість культур другого покоління без диких самців до загальної кількості культур в%. Для точної оцінки значимості перевищення частоти рецесивних леталів в досліді над контролем необхідно примінити точний критерій Фішера для

Лабораторним тваринам ввести НВ в п'ять послідовних дозах, групи повинні включати 3 тварин. Враховувати смертність.

Для подальшого табличного визначення LD 50 ефект в одній групі повинен перевищувати 50% (але не прирівнюватися до 100%), а в 2 інших повинен бути меншим 50% (але не 0) або навпаки. Результат враховувати у такому порядку:

Доза	Кількість загиблих тварин мг/кг				
	1 гр.	2 гр.	3 гр.	4 гр.	5 гр.
31,6	0	1	1	2	3

З метою скорочення табличного матеріалу перевести отримані дані доз результати на 3-х дозовий експеримент по таблиці 2. Отримані 3-х дозову послідовність підставити в таблицю. 1. Там у першій колонці знайти дозу, що вводилась, а в другій і 3 знайти значення LD 50 його інтервалів. Наприклад, для дози 31,6 і даних 5 дозового експерименту 0-1-1-2-3 (1) і для 3-х LD 50 складає 37,0 (30,6-43,4).

Застосування: Дані експрес-методу майже повністю відповідають LD 50, розрахованим методами Літчфілда-Уілкоксона і В.Б.Прозорова. Експрес-метод при економії часу, тварин і досліджуваної речовини дає можливість за допомогою однієї таблиці, визначати LD 50 і їх допустимі межі для різноманітних по токсичності хімічних сполук. Метод знаходить застосування в токсиколого-гігієнічних дослідженнях, при визначенні видової, статевої і вікової чутливості до отрути.

Таблиця 1

LD 50 і їх допустимі межі "

Доза	LD50 і їх допустимі межі при послідовності реакції	
	1-1-2	1-2-2
10	13,8 (9,2-18,3)	11,8 (7,3-16,4)
12,6	17,4 (11,5-23,2)	14,9 (9,1-20,7)
15,8	21,8 (14,6-29,0)	18,7 (11,5-26)
20	25,8 (9,3-32,2)	23,0 (16,6-29,5)
25	29,4 (24,2-34,6)	27,2 (22-32,4)
28,2	33,0 (27,2-38,7)	30,6 (24,8-36,3)
31,6	37,0 (30,6-43,4)	34,3 (27,8-40,7)
35,5	41,5 (34,3-48,8)	38,5 (31,2-45,7)
39,8	46,5 (38,5-54,6)	43,1 (35,1-51,2)
44,7	52,2 (43,2-61,3)	48,4 (39,3-57,4)
50	58,6 (48,4-68,8)	54,2 (44-64,5)
56,2	63,8 (55,4-72,1)	60,2 (51,9-68,6)
63	68,2 (62-74,3)	65,6 (59,4-71,7)
66,8	72,2 (65,8-78,7)	69,5 (63,1-75,9)
70,8	76,5 (69,7-83,3)	73,6 (66,9-80,4)
75	81,0 (73,9-88)	78,0 (70,9-85)
79,4	85,8 (78,2-93,3)	82,5 (75-90,1)
84	90,8 (82,7-99)	87,4 (79,2-95,6)
89	96,3 (89,0-103,6)	92,6 (84-101,3)
94,4	112,1 (93,1-131,1)	101,6 (76,7-126,4)

1. Електрофорезна камера, ("Лабор-Мим", м. Будапешт)
2. УФ-трансілюмінатор "Флускоп" П 004-00-ПС
3. Фотоапарат
4. Блок живлення стабілізований.
5. Терези електроні ВЛ Е-134, ГОСТ 24101-88
6. рН-метр- мілівольтметр, тип рН-150, ГОСТ 22261-82
7. Термостат ТС -80 М-2, ТУ 64-1-1382-83
8. Холодильник побутовий, ТУ 84-89
9. Колба мірна місткістю 100 мл, ГОСТ 1770-74
10. Піпетка скляна градуйована місткістю 1,0 мл, 2-й клас, ГОСТ 20772-77
11. Пробірки центрифужні, ГОСТ 1770-74
12. Циліндр мірний місткістю 25 мл, ГОСТ 1770-74

РЕАКТИВИ

1. Культура дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*
2. Хлорид натрію, кваліфікація "чда" ГОСТ 4233-77
3. Фенол, кваліфікація "чда", (Lachema, Чехія)
4. Хлороформ, кваліфікація "ч", ТУ 6-09-06-800-76
5. Ізоаміловий спирт
6. Трис-(оксиметил)-амінометан солянокислий (Трис-НСІ), кваліфікація "ч" ТУ 6-09-2477-78
7. Етилендіамінтетраоцтова кислота, ("Serva", USA)
8. Спирт етиловий 96°, ГОСТ 5962-67
4. Агароза для електрофорезу ("Lachema", Чехія)

РОЗЧИНИ

1. 3% цукровий бульйон і агар. Наважку 3 г сахарози, зваженої з точністю 0,05 г, перенести в мірну колбу місткістю 100 мл, розчинити, додати наважку агару, перемішати, підігріти та довести дистильованою водою до мітки.
2. 0,9% фізіологічний розчин: наважку хлориду натрію масою 0,9 г зважену з точністю 0,005 г, розчинити в 91 мл дистильованої води. Зберігати в холодильнику при температурі + 4°C протягом 2-х місяців.
3. 75% розчин фенолу (рН 7,2) в 0,9% розчині хлориду натрію: наважку фенолу масою 75 г зважену з точністю 0,005 г, кількісно перенести у мірну колбу на 100 мл, додати 0,9% розчин хлориду натрію до мітки, перемішати. Перевірити рН середовища.
4. 6% розчин фенолу (рН 8,3) в 0,9% розчині хлориду натрію: наважку фенолу масою 6 г зважену з точністю 0,005 г, кількісно перенести у мірну колбу на 100 мл, додати 0,9% розчин хлориду натрію до мітки, перемішати. Перевірити рН середовища.
5. Суміш хлороформ: ізоаміловий спирт 25:1. Змішати хлороформ і ізоаміловий спирт у співвідношенням 25:1.

навпіл в центрифужні пробірки. Додати в кожен пробірочку 0,2 мл 10% розчину додецилсульфату натрію і 0,2 мл 3 М ацетату натрію.

Ретельно та обережно перемішувати вміст пробірки до повної лізису клітин. Бажано застосовувати спеціальний ротор. Зразки на цьому етапі можуть бути заморожені і зберігатися при температурі -20°C . Після розморожування в 1 пробірочку додати 2 мл забуференого 75% розчину фенолу (рН 7,2) - (ДНК 1) і в 2 пробірочку 66% розчину фенолу (рН 8,3) (ДНК 2). Центрифугувати 5 хв при 3000 об/хв при кімнатній температурі. Перенести водну фазу в чисті пробірочки і екстрагувати 2 мл хлороформ-ізоамілової суміші. Центрифугувати як вказано вище.

Зібрати водну фазу і додати 5 мл 96% етанолу (охолодженого до температурі -10°C). Старанно перемішати перевертанням і залишити на 10 хв при кімнатній температурі. Центрифугувати 10 хв, виділити супернатант. Ресуспендувати осад в 70% етанолі. Центрифугувати, видалити супернатант, висушити осад сухим повітрям. Додати 0,100 мл TE-буферу і інкубувати ніч при 4°C . Аналіз зразків проводити електрофорезом при напрузі 10 В/с. Розділення ведуть в 0,7% агарозному гелі (необхідна кількість агарози набухає в холодному електрофорезному буфері без етидиума броміда на протязі 2 год., потім вариться на водяній бані до просвітління, перед заливанням в гелі вноситься етидиум бромід. Проби наносити в буфері нанесення. Після закінчення розділення фотографувати в УФ- світлі. Трактуючи результати тесту. ДНК 1 є транскрипційно активною фракцією ДНК. ДНК 2 - транскрипційно неактивною. При переході клітини в стан спокою або при «голодуванні» в ДНК накопичуються одно- і двохниткові розриви. В деяких випадках фрагментація ДНК настільки значна, що може бути встановлена електрофорезом в нейтральних умовах. Найбільш небезпечні розриви в ДНК 1 фракції, тобто в послідовностях, що транскрибуються. Цей метод дозволяє оцінити сумарно число одно- і двониткових розривів ДНК. В нормальних умовах життєдіяльності дріжджів ДНК 1 і ДНК 2 представлені однією електрофоретичною фракцією.

Література: 1. Сьяксте Н.И., Будилин А.В. Накопление разрывов в содержащей транскрибируемые последовательности фракции ДНК покоящихся и голодающих клеток // Биополимеры и клетка.-1990.-Т.6, № 1.- С.91-95. - 2. Меерсон Ф.З., Васильев В.К. Предупреждения нарушений структуры ДНК сердечной мышцы, вызванных эмоционально-боевым стрессом с помощью блокады бета-адренорецепторов и ПОЛ // Вопросы медицины.-1982. - № 2.- С. 115-118.

РЕАКТИВИ

1. Реактив "ДНК-експрес" (ЛиТех, Москва)
2. Реакційна суміш для ампліфікації (окрема для кожного виду мікроорганізму): розчин дезоксинуклеотидтрифосфатів, розчин сіксофосфатних праймерів, ПЦР-буфер, барвник (крезоловий червоний), внутрішній контроль (рекомбінантна плазміда, що має фрагмент-вставку розміром 200 п.н.), (ЛиТех, Москва)
3. Таг-полімераза (5ед/мкл), (ЛиТех, Москва)
4. Трис-(оксиметил)-амінометан, кваліфікації "ч" ТУ 6-09-2477-78
5. Кислота борна, (Фарм)
6. Етилендіамінтетраоцтова кислота, ("Serva", США)
7. Натрію гідроксид, кваліфікації "чда", ГОСТ 4328-77
8. Агароза для електрофорезу, ("Lachema", Чехія)
9. Етидіум бромід

РОЗЧИНИ

Трис-боратний буфер концентрований (5 x TBE-буфер), рН 8,0: В мікроколбу місткістю 100 мл перенести наважки трису 5,4 г, борної кислоти 2,75 г, етилендіамінтетраоцтової кислоти 0,93 г, зважених з точністю 0,01 г, додати дистильованої води та перемішати до повного розчинення реактивів; довести рН розчину до 8,0 розчином гідроксиду натрію; додати дистильованої води до мітки та ще раз ретельно перемішати; розчин зберігати в холодильнику протягом 1 місяця при температурі +8 - +10 °С.

ХІД ВИЗНАЧЕННЯ

І. Підготовка клінічного зразку

Дослідний матеріал (соскоб епітеліальних клітин з слизової устіци цервікального каналу, вагіни та ін.) за допомогою одноразових стерильних зондів перенести в пробірку з реактивом "ДНК-експрес", перемішати зонд викинути, пробірку щільно закрити.

Примітка. Для отримання клінічних проб матеріал для дослідження рекомендується поміщати безпосередньо у пробірки з реактивом "ДНК-експрес". Інші транспортні засоби і консерванти можуть викликати інгібування ПЛР.

Підготовлені таким чином зразки використовувати протягом 2-х годин для виділення ДНК або заморозити і зберігати при температурі -20°С більше 2-х тижнів. Незаморожені проби повинні бути протягом 2-х годин в термостаті з льодом) доставлені у лабораторію для проведення аналізу.

II. Виділення ДНК із клінічного зразку.

1. Пробірку з реактивом "ДНК-експрес" з матеріалом, що аналізується, ретельно перемішати протягом 10 сек.

2. До 2,0 г агарози додати 20 мл 5хТВЕ буфера і 100 мл дистильованої води.
3. Дану суміш розплавити на електричній плитці. Додати до 100 мл розплавленої агарози 10 мкл 1% розчину етидію броміду. Перемішати.
4. Охолодити агарозу до температури 50-60°C і залити у планшети з заливки геля.

Для отримання в агарозному гелі карманів, для нанесення зразків встановити на планшет гребінку. Після застигання агарози обережно витягнути гребінку з гелю і перенести планшет з гелем у камеру для проведення електрофорезу.

5. Нанести у кармани геля по 10-15 мкл ампліфікату у послідовності, яка відповідає нумерації проб. Нанести позитивні та негативні контролю.

6. Підключити електрофоретичну камеру до джерела живлення і встановити напругу, що відповідає напрузі електричного поля 10-15 В/см гелю. Провести електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації у напрямку від катоду (-) до аноду (+). Контроль за електрофоретичним розділенням проводиться візуально по русі смуги барвника. Смуга барвника повинна пройти від старту 1,5-2 см.

7. Після закінчення електрофорезу, витягнути гель з форми і перенести на скло УФ-трансілюмінатора.

Увага! З гелем агарози треба працювати у рукавичках, етидіум бромід – сильний мутаген.

8. Включити УФ-трансілюмінатор і проаналізувати результати дослідження. Фрагменти ДНК, які аналізуються, виявляються у вигляді оранжево-червоних смуг, що світяться при опроміненні УФ-опроміненням і повинні бути розташовані на рівні позитивного контролю, у разі наявності у зразку ДНК мікроорганізму.

Література: 1. Інструкція по використуванню наборів для ПЛР (ДНК) (Москва). 2. Молекулярная клиническая диагностика. Методы / Под ред. Херрингтона С., Дт. Махш. – “Мир”, 1991. - 558 с.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ЕЛЕКТРОФЕРЕЗУ В ПОЛІАКРИЛАМІДНОМУ ГЕЛІ

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Содіум додецилсульфат (SDS) – поліакриламідний гель (ПААГ) – аніонною системою завдяки негативно зарядженому SDS. Окрім того розділяти білки можна в катіонних системах. В них білки заряджені позитивно внаслідок дуже низьких значень рН буфера. Білки рухаються до негативного електроду (катоду). Червона клема підключається до нижньої камери.

3. Натрій додецилсульфат, кваліфікація "ч", ТУ 6-09-64-75
4. Спирт етиловий 96°, ГОСТ 5962-67
5. Кумасі блакитний R-250
6. Метанол, ГОСТ 6995-77
7. Льодяна оцтова кислота (ЛОК), кваліфікація "хч", ГОСТ 61-75
8. Набір реактивів (ОЕ-107-01), (Лабор-Мим, м. Будапешт):
 - акриламід, кваліфікація "чда"
 - N', N' метилен-біс-акриламід, кваліфікація "чда"
- N, N, N', N'-тетраметил-етилен-діамін (ТЕМЕД), кваліфікація "чда"
 - персульфат амонію, кваліфікація "чда"
 - гліцин, кваліфікація "чда"
 - трис(гідроксиметил)-амінометан, кваліфікація "чда"
9. Натрію гідроксид, кваліфікація "чда", ГОСТ 4328-77
10. Гліцерин, кваліфікація "чда", ГОСТ 6259-75
11. Кислота соляна концентрована, кваліфікація "чда", ГОСТ 3118-77

РОЗЧИНИ

1. Розчин, що містить 30% акриламіду, 0,8% бісакриламіду: В мірну колбу місткістю 100 мл перенести наважки акриламіду 30,0 г та метиленбісакриламіду 0,8 г, зважених з точністю 0,005 г, додати дистильовану воду та перемішати до повного розчинення реактивів; долити дистильованої води до мітки та ще раз ретельно перемішати. Профільтрувати розчин через 0,45 мм фільтр і зберігати в темноті при температурі +4°C. Реактив стабільний до 30 днів.

Багато використовувати двократно перекристалізовані реактиви. Увага! Акриламід нейротоксичний. Використовувати маску при зважуванні. Працювати з розчинами в рукавичках. Не піпетувати ротою.

2. 4 x Трис-Cl/SDS, pH 6,8. В мірну колбу місткістю 100 мл перенести наважку трис-основного 6,05 г зваженого з точністю 0,005 г, додати 40 мл дистильованої води, перемішати до повного розчинення реактиву. Довести до pH 6,8 розчином 1 М соляної кислоти. Долити дистильованої води до мітки, профільтрувати і додати наважку SDS 0,4 г зважену з точністю 0,005 г, та ще раз ретельно перемішати. Зберігати розчин при температурі +4°C протягом 30 днів.

3. 4 x Трис-Cl/SDS, pH 8,8. В мірну колбу місткістю 500 мл перенести наважку трис-основного 9,1 г зваженого з точністю 0,005 г, додати дистильованої води 300 мл, перемішати до повного розчинення реактиву. Довести до pH 8,8 1 М розчином соляної кислоти. Долити дистильованої води до мітки, профільтрувати, додати наважку SDS 2,0 г та ще раз ретельно перемішати. Зберігати розчин при температурі 4°C протягом 30 днів.

4. Буфер для електрофорезу pH 8,3. В мірну колбу місткістю 1000 мл перенести наважки трису (25mM) 14,4 г, гліцину (192 mM) 14,4 г, SDS 1

ХІД ВИКОНАННЯ

Приготування розділяючого гелю (15 мл)

В мірній колбі місткістю 25 мл змішати розчин, що містить 30% амонію персульфату, 0,8% бісакріламід, 4 x Трис-Cl, рН 8,8 і дистильовану воду (див. табл. 1). Дегазувати під вакуумом 10-15 хв. Додати 10% персульфат амонію і 11 ММД. Ретельно повертати для перемішування, негайно залити в камеру.

Концентруючий гелю (5 мл)

В мірній колбі місткістю 25 мл змішати 0,65 мл розчину, що містить 30% амонію персульфату, 0,8% бісакріламід, 1,25 мл 4 x Трис-Cl/SDS (рН 6,8) і 1,005 мл дистильованої води. Дегазувати під вакуумом 10-15 хв. Додати 0,025 мл 10% персульфату амонію і 0,005 ТЕМЕД. Ретельно повертати для перемішування. Використовувати негайно.

Увага! Проблеми з утворенням гелю залежать від персульфату і ТЕМЕД.

Приготування гелю та розміщення в апараті

1. Дві скляні пластинки старанно вимити, протерти спиртом.
2. Зібрати стекла в камері.
3. Приготувати розділяючий гелю, дегазувати, додати 10% персульфат амонію і ТЕМЕД, ретельно перемішати.
4. Примітка. Використовувати 5% гелю для білків 60-200 kD, 10% гелю для 16-70 kD, 15% гелю для 12-45 kD.
5. Використовуючи пастеровську піпетку внести розділяючий гелю по 11 см в камеру. Висота гелю повинна бути близько 11 см.
6. Використовуючи другу пастеровську піпетку обережно повинно нашарувати ізобутиловий спирт (десь 1 см).
7. Дати гелю полімеризуватися 30-60 хв при кімнатній температурі.
8. Якщо гелю не полімеризується, то це означає, що є проблеми з персульфатом і ТЕМЕД. Персульфат при розчиненні повинен шипіти.
9. Видалити шар ізобутилового спирту і промити камеру 1 x Трис-Cl/SDS (рН 8,8). Залишок спирту погіршує якість аналізу.
10. Приготувати концентруючий гелю.
11. Нашарувати концентруючий гелю на розділяючий гелю товщиною 1 см.
12. Вставити гребінку в камеру, якщо необхідно додати гелю для повного покриття гребінки. Уникати утворення бульбашок.
13. Дати гелю полімеризуватися 30-45 хв. при кімнатній температурі. При полімеризації спостерігається зміна оптичних властивостей речовин.

Приготування зразків і внесення в гелю

14. Розчинити аліквоту зразка білку 1:1 (об.об) 5 x SDS буфером зразка і нагріти 5 хв при 100°C в пробірці, що завинчується. Якщо зразок є прициптованим білком, розчинити білок в 50-100 мл 1 x SDS буферу зразка і кип'ятити 5 хв при температурі 100°C.

Приготувати стандарти молекулярної маси.

Проведення електрофорезу

23. Приєднати блок живлення і встановити 10 мА на гелі 0,75 мм товщиною до переміщення бромфенолового синього в розчинений розчин. Потім посилити напругу до 15 мА. При 15 мА на 0,75 мм гелі розділення відбувається 4-5 год. Для двох гелів або гелю 1,5 мм подається на дві сили струму. Для уникнення деформації смужок повинна контролюватися температура, шляхом циркуляції води (при 30 мА).

Необхідно слідкувати за рівнем буферу у верхній камері.

24. Коли бромфеноловий синій досягне кінця геля відключити напругу.

Фарбування гелів

Метод Кумасі блакитний

Межа фарбування 0,1 мг.

1. Одягнувши рукавички перенести гель в маленький поліетиленовий пакетик, який містить 20 мл фарби.

3. Прикріпивши пакетик до ротора фарбувати 5- 10 хв при товщині 0,75 мм, 10-20 хв при 1,5 мм.

4. Промити гель водою, декількома порціями.

5. Відфарбування Кумасі (близько 50 мл). Сильні смужки видно широкими прозорій коробці, відфарбування других смужок відбувається на прозорій кількох годин.

6. Для повного відфарбування змінити розчин і перемішувати на протязі 10 хв.

Література: 1. Сьякте Н.И., Будилин А.В. Накопление разрывов в последовательности транскрибируемые последовательности фракции ДНК покоящихся и голодающих клеток // Биополимеры и клетка.-1990.-Т.6, №1.-С.91-95. 2. Маниатис Т., Фрич Э., Сембрук Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Под ред. Баева А.А. М.: Мир, 1984. – 479 с.

СТАНДАРТНА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ІМУНОБЛОТИНГУ (Дот-блотинг)

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Імуноблотинг – стандартний метод для характеристики взаємодії антиген – антитіло, вивчення хімічної природи, біологічної активності імуногенності молекул, що беруть участь у реалізації імунної відповіді. Він дозволяє діагностику ракових, інфекційних та інших захворювань. Він дозволяє аналізувати окремі молекули, що знаходяться в складних біологічних системах, після попереднього електрофоретичного розділення. Процес переносу біологічних полііонів з електрофоретичної матриці і іммобілізації на поверхні пористої мембрани зветься блотингом, а отриманий відбиток – блотом або блотограмою. За допомогою блотингу можливо аналізувати природу біополімерів, їх антигенність і біологічну активність. На мембрані

3. Буфер розведення: TBS + 1% нормальної козячої сироватки або незжиреного сухого молока: до 99 мл буферу TBS приготуваного вказано у пункті 1., додати 1,0 мл нормальної козячої сироватки або незжиреного сухого молока, зваженого з точністю до 0,005 г та ретельно перемішати. Розчин готувати безпосередньо перед вживанням.
4. Відмивочний буфер: TBS - T + 1% нормальної козячої сироватки або незжиреного сухого молока: до 99 мл буферу TBS-T приготуваного вказано у пункті 2., додати 1,0 мл нормальної козячої сироватки або незжиреного сухого молока, зваженого на електронних терезках та ретельно перемішати; розчин готувати безпосередньо перед вживанням.

ОСНОВНІ ЕТАПИ ДОТІМУНОЗВ'ЯЗУВАННЯ

1. Нанесення антигену на нітроцелюлозні листки;
2. Блокування неспецифічної адсорбції;
3. Імунодетекція первинними антитілами;
4. Імунодетекція біотинілійованими вторинними антитілами.
5. Приєднання до біотину стрептавідинпероксидази;
6. Виявлення пероксидазної активності.

ХІД ВИКОНАННЯ

1. Підготувати нітроцелюлозу відповідно з інструкцією виробника.
2. Нанести антиген на листок нітроцелюлози у малому об'ємі 0,5 – 1 мкл. Мала площа краплі, яка містить антиген у високій концентрації приносить до кращого кольорового контрасту у порівнянні з фоном.
3. Висушити листок у потоці холодного повітря 5 хв. Всі інкубації проводити при кімнатній температурі на струшувальній платформі.
4. Інкубувати листки NC у 1% нормальній козячій сироватці або незжиреного сухого молока в TBS 16 – 20 годин при кімнатній температурі. Блокуючий етап мінімізує неспецифічне зв'язування антитіл. Блокуючі реагенти повинні змінюватись після кожної проби. Відмити листки в TBS один раз на протязі 5 хв. Для наступних етапів листок повинен бути розрізаний на смужки, якщо планується використовувати більш ніж одну антисироватку.
5. Розвести мишачі первинні антитіла у буфері розведення. Інші білки (IgG, овальбумін та інші) можуть бути використані замість нормальної козячої сироватки. Буфер розведення повинен бути використаний як негативний контроль. Помістити смужки у чашки Петрі і покрити розведеними антитілами, так, щоб смужки були покриті. Інкубувати 2 год.
6. Відмити смужки 4 рази по 5 хв., порціями по 15 хв відмивочного буферу.
7. Розвести біотинілійовані антимишині антитіла у буфері розведення (1:1000 – 1:1500).
8. Інкубувати смужки 1 годину.
9. Відмивати смужки як у п. № 6.

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. Аппарат для електропереносу;
2. Папір для блотингу ("Sigma", США № P4431);
3. Нітроцелюлоза (NC), з розміром пори 0,45µm (N5766); ("Sigma", США № 8142) або іммобілон.
4. Піпетки скляні градуйовані місткістю 0,1 мл 2-й клас ГОСТ 20197-79;
5. Whatman № 1,
6. Фільтрувальний папір, ГОСТ 12026-76
7. Терези електронні ВЛ Е-134, ГОСТ 24104-88
8. рН –метр мілівольтметр, тип рН-150, ГОСТ 22261-82
9. Холодильник побутовий, ТУ 84-89
10. Колба мірна місткістю 1000 мл, ГОСТ 1770-74

РЕАКТИВИ

1. Знежирене сухе молоко
2. Хлорид натрію, "чда", ГОСТ 4328-77
3. Трис(оксиметил)-амінометан гідрохлорид, "ч", ТУ10П 644-72
4. Фосфорнокислий натрій двозаміщений, "чд", ТУ 64-64-72
5. Калій фосфорнокислий однозаміщений, "чда", ГОСТ 4198-71
6. Льодяна оцтова кислота, кваліфікація "хч", ГОСТ 61-75
7. Натрій оцтовокислий, кваліфікація "ч", ТУ 6-09-3854-75
8. Натрію гідроксид, кваліфікації "чда", ГОСТ 4328-77
9. Бичачий сироваточний альбумін (BSA) (A7030);
10. Нормальна козяча сироватка (G9023);
11. Твин-20 (P1379);
12. 3-аміно-9-етилкарбазол (АЕС), табл. (A6926);
13. Диметилформахід, "ч", ГОСТ 20289-74;
14. Перекис водню, "чда", ГОСТ 10929-76
15. Набір реактивів (ОЕ-107-01), (Лабор-МІМ, г. Будапешт):
 - акриламід, кваліфікації "чда"
 - N', N' метілен-біс-акриламід, кваліфікація "чда"
 - N, N, N', N'-тетраметил-етилен-діамін пероксидисульфат амонію, кваліфікація "чда"
 - гліцин, кваліфікація "чда"
 - трис(гідроксиметил)-амінометан, кваліфікація "чда"
16. Метанол, кваліфікація "чда", ГОСТ 6995-77

РОЗЧИННИ

1. Буфер переносу: В мірну колбу місткістю 1000 мл перенести 12,1 г трис(гідроксиметил)-амінометану, 57,67 г гліцину, зважених з точністю до 0,005 г, 800 мл метанолу, перемішати до повного розчинення реактивів

- NC мембрана, яка змочена дистильованою водою;
- Гель;
- 3 листка паперу для блотингу, які змочені 0,02 М трис-основа, 50 метанол, 5,25 мкг/мл ϵ -амінокапронової кислоти.

Проводити перенесення при 90 мА 2-3 год при кімнатній температурі.

Видалити NC мембрану з апарату і висушити на повітрі (суха мембрана може зберігатись при температурі 2-8° С між двома аркушами паперу в пластиковому пакеті).

3. Блокувати остаточні ділянки зв'язування на мембрані шляхом інкубації 2 години при кімнатній температурі (або ніч при температурі 4°С) в 1% незжиреному сухому молоці (або 2% желатин, або БСА) в TBS при струшуванні на шейкері. Смужку целюлози покласти стороною, якою вона прилягала до гелю;

4. Відмити мембрану 1-3 години при кімнатній температурі у розчині первинних антитіл в TBS (на 15 мл розчину 250 мкл культурантисеруму середовища, 10 мкл поліклональних антитіл або 2-4 мкл асцитичної рідини приблизно 20 мкл антитіл), орієнтовно в розведенні 1:1000;

5. Ретельно промити двічі по 15 хв з 50 мл TBST-1% молоко;

6. Інкубувати 1 годину в мінімальному об'ємі TBST-1% молоко, яке містить вторинні антитіла зв'язані з пероксидазою хрому. Концентрація антитіл повинна бути попередньо оптимізована (орієнтовне розведення 1:500);

7. Ретельно промити мембрану в 50 мл TBST-1% молоко 15 хв, змінивши TBST-1% молоко і інкубувати ще 30 хв при кімнатній температурі;

8. Провести виявлення пероксидазної активності за допомогою субстратного розчину (AEC): інкубувати листок нітроцелюлози субстратному розчині 10-15 хв. Червоний нерозчинний преципітат характеризує комплекс антиген-антитіло. Смужка звичайно має червоне забарвлення.

9. Відмити смужку у дистильованій воді.

10. Висушити смужку між листками фільтрувального паперу в потоці холодного повітря.

11. Листки можна зберігати у темноті, у пластикових пакетах.

Література: 1. Bunette W. N. // Anal. Biochem., 112, 195-203 (1981). – 2. Hames B. D., Rickwood D. (eds), "Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach", IRL Press Ltd., Oxford (1981). – 3. Gershoni J. M., Palade G. E. // Anal. Biochem. 131, 1-15 (1983). – 4. Immunology Methods Manual (The Comprehensive Sourcebook of Techniques). Edr. I. Lefkovits. Academic Press, 1997. P. 1165-1166.

Стандартна методика визначення каолінового часу в плазмі крові.....	
Стандартна методика визначення кефалінового часу в плазмі крові.....	
Стандартна методика визначення фактору V.....	
Стандартна методика визначення тромбінового часу мікрометодом	
Стандартна методика визначення концентрації фібриногену в плазмі крові	
Стандартна методика визначення активності фактору XIII.....	
Стандартна методика визначення фібринолітичної активності методом лізису еуглобулінів плазми	
Стандартна методика визначення вільного гепатиту	
Стандартна методика визначення плазміну, плазміногену і сумарної фібринолітичної активності	
Стандартна методика проведення еталонного тесту.....	
Стандартна методика визначення фібриногену В (β -нафтоловий тест).....	
Стандартна методика визначення розчинних фібрин-мономерних комплексів (РФМК) та риніх продуктів деградації фібриногену (РПДФ).....	
Стандартна методика визначення антитромбіну III в плазмі крові	
Стандартна методика визначення швидко- і повільнодіючих інгібіторів плазміну	

Розділ 3. МЕТОДИ ПРОВЕДЕННЯ ІМУНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Стандартна методика визначення експресії поверхневих антигенів клітин за допомогою непрямой імунофлуоресценції	
Стандартна методика визначення імуноглобулінів класів А, G, М методом радіальної дифузії в гелі по Манчіні.....	

3	стандартна методика визначення секреторного імуноглобуліну А людини методом імунодифузії в гелі по Манчіні.....	55
18	стандартна методика уноферментного визначення імуноглобулінів.....	57
16	стандартна методика визначення циркулюючих імунних комплексів.....	59
20	стандартна методика проведення реакції бласттрансформації.....	61
10	стандартна методика визначення фагоцитарної активності нейтрофілів	64
11	стандартна методика визначення кисень – активуючої здатності лейтрофілів за НСТ–тестом.....	66
11	стандартна методика визначення активності лізосомальних катіонних білків	68
11	стандартна методика встановки прямої проби Кумбса	70
10	стандартна методика імуногістохімічного визначення антигену.....	71
10	стандартна методика визначення тривалості тканинних екстрактів для імунологічних досліджень	76
	Розділ 4. МЕТОДИ ПРОВЕДЕННЯ БІОХІМІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	78
40	стандартна методика визначення активності аспартат-амінотрансферази АсАТ (AST) аланін-амінотрансферази АлАТ (ALT) в сироватці крові (дінітрофенілгидразиновим методом).....	78
	стандартна методика визначення аскорбінової кислоти в тканинах	80
48	стандартна методика визначення загального білку в сироватці крові за біуретовою реакцією.....	83
18	стандартна методика визначення білірубіну в сироватці крові (по Ієндришику) (мікрометод).....	86
2	стандартна методика визначення активності каталази в крові.....	89

Стандартна методика визначення концентрації церулоплазміну у сироватці крові.....	
Стандартна методика визначення загального холестерину у сироватці крові прямим методом (по Ільку).....	
Стандартна методика визначення активності супероксиддисмутази в крові	
Стандартна методика визначення концентрації дієнових кон'югатів у сироватці крові.....	
Стандартна методика визначення активності лужної і кислотної фосфатаз в сироватці крові (по гідролізу в-гліцерофосфата).....	
Стандартна методика визначення глюкози в сироватці крові ферментативно.....	
Стандартна методика визначення активності ксантиноксидази	
Стандартна методика визначення активності лейцинамінотрипсидази (ЛАІТ).....	
Стандартна методика визначення ліпази у сироватці або плазмі крові	
Стандартна методика визначення спектру нейтральних ліпідів мембран еритроцитів та сироватки крові методом ТСХ.....	
Стандартна методика визначення концентрації піровиноградної кислоти (ПВК) в печінці тварин	
Стандартна методика визначення концентрації ТБК-активних продуктів	
Стандартна методика проведення проби Вельтмана.....	
Стандартна методика визначення активності лактатдегідрогенази в сироватці крові.....	
Стандартна методика визначення фосфоліпідів і перекисів ліпідів мембран еритроцитів методом ТСХ	
Стандартна методика визначення осмотичної резистентності еритроцитів.....	
Стандартна методика визначення кислотної резистентності еритроцитів	
Стандартна методика визначення механічної резистентності еритроцитів.....	

	стандартна методика	
	визначення концентрації β -та	
97	β -ліпопротеїдів в сироватці крові.....	130
	стандартна методика	
	визначення титлової проби	132
98	стандартна методика	
	визначення білку за допомогою кумасу бриліантового блакитного	134
99	стандартна методика	
	визначення неограниченого фосфору	
100	сироватці крові з малахітовим зеленим	135
	стандартна методика	
	визначення концентрації сіалових кислот	
101	сироватці крові за реакцією з оцтово-сірчанокислим	
	активом (реакція Гесса)	137
102	стандартна методика	
	визначення концентрації поліпептидів.....	139
103	стандартна методика	
	визначення антитриптичної активності слиши.....	142
104	стандартна методика	
	визначення активності α - амілази.....	145
105	стандартна методика	
	визначення сечовини в сироватці крові та сечі за кольоровою	
	реакцією з диацетилюмоноксидом	147
106	стандартна методика	
	визначення загальних ліпідів в сироватці крові	149
	стандартна методика	
107	визначення кальцію в сироватці крові та сечі з	
	фто-крезолфталейнокомплексом.....	151
108	стандартна методика	
	визначення креатиніну в сироватці крові або сечі	
	(по кольоровій реакції Яффе).....	152
	стандартна методика	
109	визначення глікогену в тканині печінки	
	пварин (по Зейфтер).....	154
	стандартна методика	
110	кількісного визначення РНК та ДНК	
	в субклітинних фракціях клітин тварин.....	156
111	стандартна методика	
	визначення середніх молекул в сироватці крові	158
112	стандартна методика	
	визначення залишкового азоту крові (сечі) після	
113	мініералізації прямою реакцією з реактивом Несслера.....	160

Стандартна методика спектрофотометричного визначення концентрації деяких жиророзчинних вітамінів у плазмі (сироватці) крові та тканинах.....

Стандартна методика

визначення відновленого та загального глутатіону.....

Стандартна методика

визначення гідроксилазної активності

в сироватці крові хрому P_{150}

Стандартна методика

визначення глікозильованого гемоглобіну.....

Стандартна методика

визначення концентрації вільного оксипроліну в сироватці крові.....

Стандартна методика

визначення концентрації білку в слині методом Лоурі.....

Стандартна методика

визначення концентрації хлору в сироватці крові

та сечі меркуриметричним титруванням.....

Стандартна методика

визначення тригліцеридів.....

Стандартна методика

визначення активності цитохромоксидази.....

Стандартна методика

визначення спонтанного гемолізу еритроцитів.....

Стандартна методика

визначення неорганічного фосфору

в сироватці крові або сечі.....

Стандартна методика

спектрофотометричного визначення концентрації

гідроперекисей ліпідів (ГПЛ) у плазмі

(сироватці) крові або тканинах.....

Розділ 5 МЕТОДИ ПРОВЕДЕННЯ

ЦИТОХІМІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....

Стандартна методика

визначення оцінки результатів цитохімічних досліджень.....

Стандартна методика

цитохімічного визначення РНК.....

Стандартна методика

цитохімічного визначення сідеробластів і сідероцитів.....

стандартна методика іохімічного визначення сукцинатдегідрогенази.....	194
стандартна методика іохімічного визначення ДНК.....	196
стандартна методика іохімічного визначення глікогену.....	197
стандартна методика іохімічного визначення ліпідів суданом III.....	199
стандартна методика іохімічного визначення ліпідів суданом чорним B.....	200
стандартна методика іохімічного визначення пероксидази.....	202
стандартна методика іохімічного визначення кислій фосфатази.....	203
стандартна методика іохімічного визначення лужної фосфатази.....	204
стандартна методика визначення кислот муконісахаридів.....	206
Розділ 6. МЕТОДИ ПРОВЕДЕННЯ	
ГІСТОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	208
стандартна методика фіксації біологічного матеріалу.....	208
стандартна методика заливки біологічних матеріалів в парафін.....	210
стандартна методика зберігання гістологічних препаратів і методом Браше.....	213
стандартна методика зберігання гістологічних препаратів гелатоксилін-еозином.....	215
стандартна методика зберігання гістологічних препаратів і методом Маллорі (модифікація).....	216
стандартна методика зберігання за методом Валлярту і Уетту.....	219
стандартна методика зберігання нервової тканини по Ейнарсону.....	221
стандартна методика зберігання гістологічних препаратів і методом Ван Гізона.....	223

Стандартна методика приготування препаратів для флюорохромування	
Стандартна методика визначення оцінки довжини об'єктів на гістологічних препаратах	
Стандартна методика проведення морфометрії органів і тканин (оцінка площі об'єктів)	
Стандартна методика підготовки тканин для електроіно-мікроскопічного дослідження	
Стандартна методика фарбування гістологічних препаратів нервової тканини по Ніслю (модифікація)	
Стандартна методика фарбування гістологічних препаратів залізним гематоксиліном за Гейденгайном	
Стандартна методика імпрегнації сріблом дегенеруючих волокон у головному мозку	

Розділ 7. МЕТОДИ ІНДУКЦІЇ ПАТОЛОГІЧНИХ СТАНІВ

Стандартна методика відтворення експериментального діабету	2
Стандартна методика унілатеральної нефректомії з алостатичною трансплантацією нирки	2
Стандартна методика відтворення фтористого нефриту	2
Стандартна методика індукції аутоімунних пошкоджень органів	2
Стандартна методика підготовки тканинних антигенів	2
Стандартна методика відтворення нефриту мазугі	2
Стандартна методика відтворення аутоімунного пошкодження судин	2
Стандартна методика відтворення гострого токсичного гепатиту	2
Стандартна методика відтворення експериментальної гострої ішемії Міокарду	2

<i>Метод обліку рецесивних летальних мутацій у дрозофіли</i>	286
<i>Стандартна методика визначення середньосмертельних доз хімічних речовин (LD50) (експрес-метод)</i>	288
<i>Стандартна методика оцінки пошкоджень хромосом шкідливими речовинами і випромінюваннями</i>	290
Розділ 9. МЕТОДИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ	294
<i>Стандартна методика якісного визначення ДНК мікроорганізмів у біологічних зразках методом полімеразної ланцюгової реакції</i>	294
<i>Стандартна методика проведення електрофорезу в поліакриламідном у гелі</i>	297
<i>Стандартна методика проведення імуноблотингу (Дот-блотинг)</i>	303
<i>Стандартна методика проведення муноблотингу (Western blotting)</i>	306
ЗМІСТ	310

Наукове видання

Беркало Л.В.,
Бобович О.В.,
Боброва Н.О.,
Гейко О.О.,
Кайдашев І.П.,
Куценко Л.О.,
Ножинова О.А.,
Рябенко В.В.,
Соколенко В.М.,
Шинкевич В.І.

МЕТОДИ КЛІНІЧНИХ ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ В МЕДИЦИНІ

Редактор О.І. Пічкарь
Технічний редактор О.І. Пічкарь
Коректор Кайдашев І.П.
Комп'ютерна верстка М.Ю. Кондратов

*Підписано до друку 22.07.03
Формат 60x84/16. Папір офсетний 60 г/м²
Гарнітура Times New Roman.
Ум.-друк. арк. 18,83. Ум. фарб.-відб. 18,89
Обл. вид. арк. 21,87. Тираж 100.
Зам. № В-4*