

ГБОУ ВПО СЕВЕРО-ОСЕТИНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ
Министерства здравоохранения Российской Федерации

КАФЕДРА НОРМАЛЬНОЙ ФИЗИОЛОГИИ

**Методические рекомендации
по изучению водно-солевого обмена
и мочеобразовательной функций почек
в эксперименте**

Методические рекомендации составлены ассистентом кафедры нормальной физиологии, канд.мед.наук Э.М.Гагловой под общей редакцией зав.каф. проф. В.Б.Брина

Владикавказ 2013

Методические рекомендации предназначены для студентов проводящих исследования в СНК кафедр, аспирантов и молодых ученых, выполняющих экспериментальные диссертационные работы.

Рецензент - доктор мед. наук, профессор И.Г. Джигоев

Печатается в соответствии с решением научного координационного совета СОГМА (№ протокола 4) от « 20 » мая 2013г.

СОДЕРЖАНИЕ

ПОСТАНОВКА ЭКСПЕРИМЕНТА	4
<i>Некоторые особенности содержания, кормления и разведения лабораторных животных</i>	<i>4</i>
<i>Способы фиксации лабораторных животных</i>	<i>8</i>
<i>Способы введения тестируемых препаратов</i>	<i>11</i>
<i>Способы взятия крови</i>	<i>16</i>
<i>Опыты в условиях спонтанного диуреза и их оценка</i>	<i>18</i>
<i>Опыты с функциональной водной нагрузкой и их оценка</i>	<i>20</i>
МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ВОДОВЫДЕЛИТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ ПОЧЕК	23
<i>Основные процессы мочеобразования (Диурез, скорость клубочковой фильтрации, канальцевая реабсорбция воды)</i>	<i>23</i>
<i>Определение креатинина в моче и плазме крови</i>	<i>25</i>
<i>Определение белка в моче и плазме крови</i>	<i>28</i>
МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ЭЛЕКТРОЛИТОВЫДЕЛИТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ ПОЧЕК	33
<i>Показатели почечной обработки основных электролитов – Na, K, Ca (фильтрационный заряд, канальцевая реабсорбция, экскреция катионов)</i>	<i>33</i>
<i>Определение натрия и калия в моче и плазме крови</i>	<i>34</i>
<i>Определение кальция в моче и плазме крови</i>	<i>42</i>
МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ОСМОРЕГУЛИРУЮЩЕЙ ФУНКЦИИ ПОЧЕК	44
<i>Количественная характеристика</i>	<i>44</i>
<i>Определение мочевины в слоях тканей почки</i>	<i>46</i>
<i>Определение натрия и калия в слоях тканей почки</i>	<i>50</i>
ПРИЛОЖЕНИЕ	53
<i>Лабораторные показатели крыс</i>	<i>53</i>
ЛИТЕРАТУРА	55

«Искусство состоит не в том, чтобы получить нужные результаты путем применения дорогих и сложных приборов, важно достигнуть цели с помощью самых обыкновенных средств, но это возможно только тогда, когда работающий хорошо усвоит правильное и разумное их применение»

Д.И. Менделеев

ПОСТАНОВКА ЭКСПЕРИМЕНТА.

Некоторые особенности содержания, кормления и разведения лабораторных животных.

Наиболее распространенным объектом для изучения функции почек являются крысы (род *Rattus*, семейство мышьеобразных (*Muridae*)).

Белые крысы являются альбиносами черной (*Rattus rattus*) и серой (пасюк — *Rattus norvegicus*) пород. Альбиносов норвежской крысы стали разводить в Англии, начиная с XVIII в., в качестве экзотических экспонатов в зоопарках (зверинцах). Считается, что такие линии современных крыс, как Вистар, Левис, Спрагью-Доули, происходят только от норвежской (серой) крысы (Бландова З.К. 1983).

Опыты, проводимые на крысах, отличаются простотой и доступностью. Удобство использования крыс в эксперименте для исследования водно-солевого обмена, токсических эффектов химических и биологических препаратов объясняется простотой их содержания, устойчивостью к инфекционным заболеваниям, большим приплодом, который они дают, небольшим весом. Возможность размещения на сравнительно небольшой территории достаточного количества животных позволяет проводить массовые опыты. Крыс легко фиксировать рукой, постоянная наполненность желудка пищей при обычном режиме питания позволяет вводить им интрагастрально достаточные дозы токсических агентов, не вызывая катаральных изменений слизистой.

Предпочтение в исследованиях отдается половозрелым особям самцам, с целью исключения возможных гормональных циклов, отмечающихся у самок, а также влияния возрастных сдвигов в эндокринной системе на водно-солевой обмен.

Главное в любом эксперименте – это получение объективных (достоверных) данных, которые могут быть воспроизведены в повторных опытах. Этого можно достичь лишь при соблюдении стандартности всех условий и материалов эксперимента.

Если речь идет о медико-биологических исследованиях на животных, то стандартными или приближенными к стандартным должны быть зоогигиенические условия содержания животных (плотность посадки, скорость воздуха, влажность воздуха, чистота воды, подстилочный материал и пр.), кормление животных и сами животные.

Наиболее слабое звено в медико-биологических исследованиях – это сами животные. При проведении исследований необходимо выровнять животных в опытных и контрольных группах по виду, полу, возрасту и физиологическому состоянию, а также необходимо обеспечить генетическую стандартность, которая достигается использованием в экспериментах генетически контролируемых животных, в т.ч. линейных животных и гибридов F1.

В экспериментальной практике повсеместно используются линейные или инбредные животные, которые обладают рядом преимуществ по сравнению с нелинейными, главным из которых является генетическая однородность, гарантированно обеспечивающая воспроизводимость результатов экспериментов. Инбредной линией называют совокупность животных, размножаемых скрещиванием брат x сестра в течение не менее 20 поколений, что обеспечивает их гомозиготность и гистосовместимость. Каждая инбредная линия – это один закрепленный инбридингом генотип (Бландова З.К. и др. 1979). С историями создания линий экспериментальных животных можно ознакомиться в следующих источниках литературы (Бландова З.К., Душкин В.А. и др. 1983; Каркищенко Н.Н. 2004)

Любые отклонения от нормы условий содержания и кормления экспериментальных животных неизбежно приводят к искажению результатов научных исследований, особенно при изучении функций почек.

Белых крыс содержат в помещениях, которые имеют хорошую вентиляцию, достаточное освещение и равномерную температуру (20—22 °С). Лабораторные крысы плохо переносят холод. Влажность воздуха в помещениях не должна превышать 40—45 %.

Основные требования к условиям содержания лабораторных животных в современных вивариях рассматриваются в правилах GLP - 43 RF 60013, Dec. 22, 1978;

Клетки необходимо строить трех типов: для взрослых самцов, самок с приплодом и молодых крыс. Самцов рекомендуют содержать в небольших одноярусных клетках с передней стенкой из проволочной сетки.

Кроме ежедневной уборки необходимо 1-2 раза в неделю менять подстилку в клетках. Клетки 1—2 раза в месяц тщательно моют и дезинфицируют (хлорной известью, креолином, либо раствором формалина).

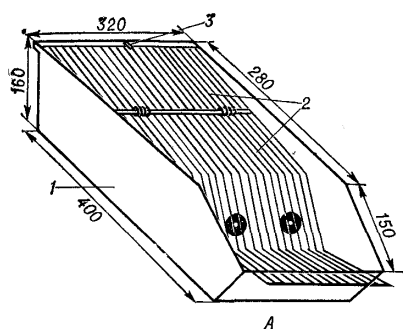


Рис.1. Схема клетки для содержания крыс
1 – пластмассовый ящик;
2 – оцинкованная сетка;
3 – замки (защелки).

Крысы — всеядные животные, поэтому нельзя ограничиваться дачей однообразных кормов растительного происхождения, а следует организовать рациональное кормление. В рационе крыс должен содержаться меньший процент жиров и животного белка, чем в пище человека: 25% белка, 10% жира и 60% углеводов (Mark A. et al, 2006). Корм грызунов в основном должен состоять из зерна (т.е. углеводов), но крысы, недополучающие продукты животного происхождения (молоко, мясо, мясо-костную муку, творог, яйца) и необходимое количество минералов и витаминов, перестают расти.

Суточная потребность в кормах взрослой крысы составляет в среднем 30—32 г, из них 25 г смешанного корма и 5—7 г овощей и фруктов. Беременным и кормящим самкам дают еще 5 г молока. Корм нужно давать в достаточном количестве, так как крысы плохо переносят голодание, что может послужить причиной каннибализма. Кормят крыс обычно 2 раза в сутки. Ввиду того что крысы — ночные животные и едят в темное время суток, основную часть корма следует давать вечером, примерно к 20 ч. Не рекомендуется резко менять пищевой режим, особенно в период проведения экспериментов. Для удовлетворения потребности стачивания постоянно растущих резцов (резцы

крысы вырастают на 127 мм в год) можно положить в клетку к грызунам подсушенные ветки фруктовых или просто лиственных неядовитых растений - липы, акации, березы, дуба (Рахманов А.И., 2000).

Используется два вида рационов для лабораторных животных: рацион для разведения и рацион для содержания в эксперименте. Недопустимо использовать рацион, предназначенный для разведения при содержании животных в условиях эксперимента (если это не обусловлено характером эксперимента). Если же использовать корм для содержания в эксперименте в целях разведения животных, то, как минимум, можно получить снижение плодовитости.

Для разведения следует отобрать здоровых, подвижных животных с блестящей шерстью. Случного периода самки достигают в 3—4-месячном возрасте, а самцы — несколько позднее. На одного самца отводят 5 самок. Продолжительность беременности — 20—26 дней. Видимые признаки беременности отмечаются со второй недели. Самка в одном помете приносит 5—9 детенышей, а за год бывает 5—9 пометов. Таким образом, самец и самка за год оставляют потомство, насчитывающее 40 и более крысят.

Во время кормления и беременности самки должны получать жидкости больше, чем обычно (лучше в виде молока) и полноценное питание. В период лактации (3 нед.) нельзя сменять подстилку в гнездах, так как самка может отказаться от своего потомства или погрызть крысят. Молодняк отсаживают в отдельные клетки, а в возрасте 100—110 дней сортируют по гнездам.

Т а б л и ц а 1 Живая масса и размеры белых крыс в зависимости от возраста (по К. Л. Ковалевскому, 1958)

Возраст, дни	Масса, г						Длина, мм			
	макси- маль- ная	сред- няя	мини- маль- ная	макси- маль- ная	сред- няя	мини- маль- ная	тела		хвоста	
							самец	самка	самец	самка
При рож- дении	6,3	5,3	4,3	5,8	5,0	4,2	54	53	22	22
7	10,0	9,1	8,2	9,7	8,8	7,9	65	64	36	36
14	21,3	17,2	13,1	19,8	16,1	12,4	80	79	52	51
28	58,1	49,1	40,1	54,2	45,1	36,0	112	110	88	87
35	60,0	50,5	41,0	56,2	47,2	38,2	125	123	96	94
63	116,5	90,4	64,3	98,6	79,9	61,2	169	162	138	135
91	203,2	153,3	103,4	190,1	137,1	84,1	189	176	163	160
120	284,3	215,4	146,5	218,4	170,3	132,2	194	181	167	163
150	307,4	238,6	169,8	230,2	189,4	148,6	197	188	174	169
180	323,4	257,6	182,2	241,1	199,4	157,7	211	199	181	174

Спустя 2—3 недели после отнятия молодняка самку можно использовать для дальнейшего воспроизведения потомства. Способность к репродукции у самок заметно ослабевает после 5—6 родов. Менопауза у самки наступает в возрасте 15—18 месяцев (в среднем на 450-й день). Продолжительность жизни крысы — 2—3 года. Данные о массе и размерах тела белых крыс в зависимости от возраста представлены в табл. 1.

Способы фиксации лабораторных животных.

Белые лабораторные крысы отличаются от диких относительно спокойным поведением. Ежедневное общение с человеком делает этих животных вполне прирученными. Однако во время проведения опытов на крысах нельзя допускать грубого обращения, причинять им боль, хватать животных щипцами и т. д. Берут животное за спину или хвост. При некоторых манипуляциях для фиксации животного вполне достаточно бывает взять его за кожу в области спины (рис. 2), а большим и указательным пальцами, удерживая крысу с боков, выдвинуть передние конечности кпереди (рис. 3).

При наличии помощника обездвиживание животного производят следующим образом. Успокаивают животное поглаживанием, затем помощник правой рукой берет крысу за кожу в области затылка и фиксирует этим голову и передние конечности, а левой рукой удерживает задние конечности и хвост. После этого животному придают нужное положение.

Во избежание укусов с неприрученными крысами нужно работать в резиновых или кожаных перчатках.

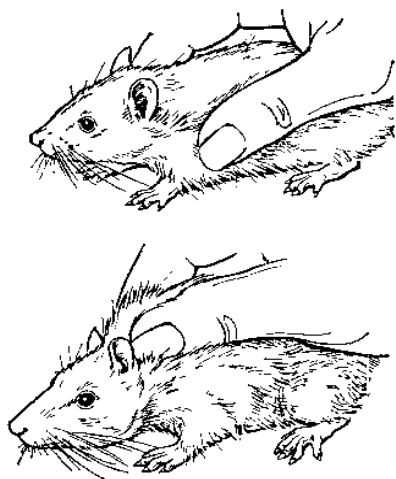


Рис.2. Этапы захвата крысы рукой.

Рис.3. Фиксация крысы в руке.



Для иммобилизации ненаркотизированных крыс А. Х. Коган (1983) сконструировал удобную универсальную камеру из плексигласа (Рис.9). Пользоваться такой камерой очень удобно при заборе крови или введении различных препаратов, проведении пункции хвостовой вены, при измерении давления крови у крыс плетизмографическим способом, для записи электрокардиограмм и др.

Для фиксации крыс предложен ряд других специальных приспособлений — гильзы из проволочной сетки, цилиндры. Удобно фиксировать крысу, завернув ее в салфетку, сетку из мягкой проволоки или специальные жилеты, разнообразной конструкции фиксаторы и камеры (Западнюк И.П. и др. 1983).

Для нанесения исследуемых препаратов на кожу крыс и исключения метода фиксации животного на спине С. Д. Ковтун и Н. В.Кокшарева (1970) предложили специальные жилеты, изготавливаемые из автокамерной резины (рис. 4, 5).

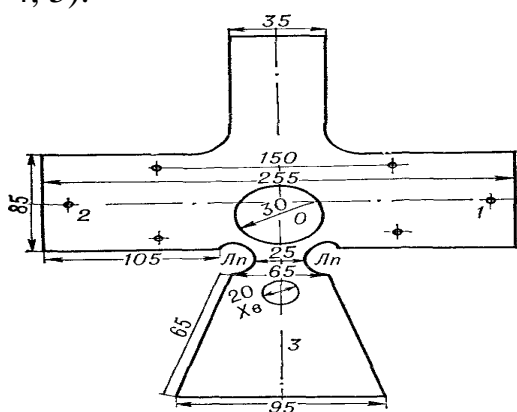
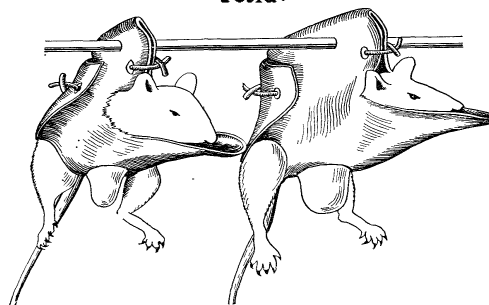


Рис.5. Фиксация крыс при помощи жилетов.

Рис.4. Схема и размеры (мм) жилетов для фиксации крыс (по С.Д. Ковтуну, Н.В. Кошкаревой, 1970)

Лп — вырез для задних лап; Хв — вырез для хвоста; О — окно для нанесения веществ на кожу; Г — участок для головы, 1, 2 — отверстия для фиксации жилета на штативе, 3 — участок для задней части тела.



В жилете имеются выступы для задних лап. Исследуемые вещества наносят через окно диаметром 29—30 мм. Чтобы фиксировать крысу, ее помещают головой к выступу (Г) и соединяют концы с отверстиями (1 и 2), заворачивая животное в лоскут. После этого пропускают задние лапы в соответствующие вырезы (Лп), а хвост в отверстие (Хв) и поднимают фартучек, охватывая ими соединенные вместе задние концы лоскута. Эти соединения, а также передние концы резины над головой закрепляют зажимами. При помощи фартучка задние конечности хорошо фиксированы, свободно вытянуты, а туловище и передние лапы достаточно ограничены в движениях. Через совмещенные отверстия (1 и 2) животное подвешивают на штативе (рис. 5).

Иммобилизованные животные ведут себя спокойно, так как им ничто не причиняет болезненных ощущений.

При необходимости произвести внутрибрюшинные или подкожные инъекции Н. И. Ложкин (1971) рекомендовал простой и удобный фиксатор (рис. 6).

Зажим фиксатора состоит из щечек, соединенных между собой шарнирно посредством оси, которая является частью ориентирующего стержня. Щечки зажима изогнуты по форме грудной клетки крысы. Откидная стяжка с резьбой обеспечивает фиксацию крыс различной величины. Она укрепляется на оси в прорези одной из щечек и имеет на конце резьбу с зажимной гайкой. Щечки зажима всегда открыты благодаря наличию пружины, укрепленной на оси стержня. Предельное раскрытие щечек ограничивается упором обратных их концов друг в друга. На свободном конце ориентирующего стержня по его длине располагается прямолинейная пластинка с продольным углублением посередине.

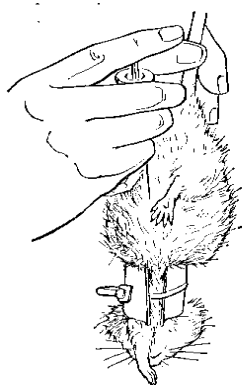


Рис.6. Положение крысы при использовании фиксатора Н.И.

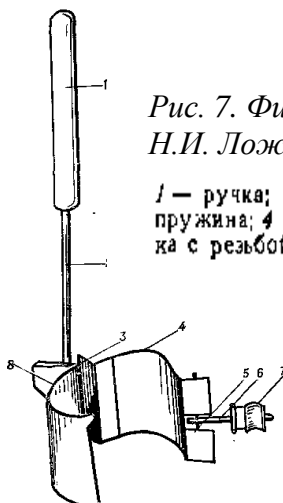


Рис. 7. Фиксатор для крыс конструкции Н.И. Ложкина (1971):

1 — ручка; 2 — ориентирующий стержень; 3 — пружина; 4 — щечки; 5 — ось; 6 — откидная стяжка с резьбой; 7 — зажимная гайка; 8 — обратный конец щечек.

Чтобы фиксировать крысу, щечки описанного зажима накладывают на грудную клетку животного, после чего вращением зажимной гайки сближают щечки до плотной фиксации животного. Хвост крысы фиксируют большим пальцем левой руки в углублении прямолинейной пластинки ручки. Животное опрокидывают головой вниз и без услуг помощника производят инъекции.

Способы введения тестируемых препаратов.

Экспериментаторам следует помнить, что реакции у крыс, мышей и других лабораторных животных на всевозможные раздражители, в том числе на введение лекарственных препаратов, ядов, существенно зависят от группового или изолированного содержания. Токсические и смертельные дозы многих веществ у сгруппированных животных в десятки раз отличаются от доз того же препарата, введенного животным той же популяции, возраста и пола, но содержащихся изолированно.

Необходимо обратить внимание и на состав кормов, хотя они и относительно стандартны. Значение имеет поступление пищевых сорбентов (пектинов и др.), способных увеличивать выведение тестируемых препаратов, баланс жидкости в организме, поступление минеральных солей, которые могут конкурировать за транспортные системы. Интенсивность токсического воздействия возрастает при ограниченном доступе к воде, либо при введении токсического вещества перед кормлением животных.

Роль указанных факторов возрастает при проведении хронических экспериментов, чем вероятно можно объяснить противоречивость данных литературы, где при воздействии сходных дозировок токсикантов разные авторы указывают на существенно различной интенсивности эффекты при длительном введении (Саноцкий И.В. 1970).

Оральное введение. Для введения в организм белой крысы порошкообразных веществ приготавливают пилюли, смешивая исследуемые вещества с мукой, хлебом или растворяя их в молоке. Пилюли дают подопытным крысам, рассаженым в отдельные клетки. Если животные отказываются поедать пилюли или молоко с примешанными препаратами, прибегают к принудительному введению при помощи желудочного зонда.

Успокоенную крысу берут левой рукой за кожу в области затылка таким образом, чтобы большой палец находился у угла рта крысы.левой ладонью слегка прижимают животное к столу и обездвиживают. Голову крысы кладут на левую сторону.

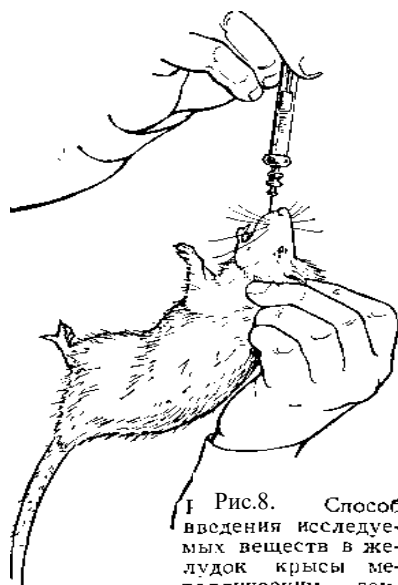


Рис.8. Способ введения исследуемых веществ в желудок крысы металлическим зондом.

Большой палец отодвигают кверху и назад, открывают при этом рот и начинают вводить резиновый зонд диаметром 2—3 мм, предварительно смоченный глицерином. Зонд должен идти над языком, по возможности ближе к щекам. Если продвижение зонда встречает препятствие, то его следует вынуть и вновь попытаться ввести.

Необходимо учитывать, что при внутрижелудочном введении короткий зонд создает условия для попадания токсических веществ в дыхательные пути, что может в значительной степени изменить степень токсического воздействия, особенно при длительном введении веществ, обладающих местными резорбтивными свойствами на слизистые в условиях хронического эксперимента. При эндотрахеальном введении – эффективные дозы веществ существенно возрастают.

Вместо резинового удобно пользоваться металлическим зондом изготовленным из иглы для шприца (достаточной длины, позволяющий наверняка быть уверенным в поступлении веществ непосредственно в желудок, препятствуя обратному рефлексорному выбросу вводимого вещества). Для этого острый конец иглы стачивают и на него напаивают головку из олова. Полученный зонд следует слегка дугообразно изогнуть. Введение металлического зонда в желудок крысы не является затруднительным. Приученных к этой манипуляции крыс левой рукой удерживают за кожу в области затылка, придав им положение головой вверх. Большим и указательным пальцами натягивая щеки, открывают крысе рот. Металлический зонд, надетый на шприц и находящийся в правой руке, начинают вводить по задней стенке глотки, затем голову животного слегка опрокидывают кверху и назад (для этого указательным пальцем левой руки натягивают кожу головы в

области затылка или между ушами), а зонд продвигают по ходу пищевода. Когда головка зонда находится в области шейного изгиба, то наружный конец его следует немного опустить (рис. 8). Обычно зонд проходит свободно и его введение не сопровождается осложнениями. Необходимо тщательно следить, чтобы головка зонда не имела острых выступов.

Интраназальное введение. Техника введения такая же, как и у других животных. Допустимо вводить до 0,4 мл жидкости.

Ректальное введение. Способ введения не отличается от такового у других животных. Максимально допустимая доза — 1 мл жидкости.

Кожное введение. На коже, лишенной волосяного покрова, делают насечки скальпелем, скарификационной иглой или наждачной бумагой, после чего наносят исследуемый материал.

Внутрикожное введение. В задней части спины или на животе выбривают шерсть или удаляют волосяной покров при помощи депилятора. Тоненькую иглу вводят в кожу на 1—3 мм, после чего инъецируют исследуемый раствор в количестве 0,02—0,04 мл.

Подкожное введение. Помощник фиксирует животное. Шерсть на предполагаемом месте укола выстригают и дезинфицируют кожу. На спине или сбоку пальцами левой руки приподнимают кожу в виде складки, в основание которой затем делают укол. Иглу проводят параллельно складке. При введении больших количеств жидкости направление иглы нужно менять несколько раз. Взрослой крысе допустимо вводить под кожу до 10 мл жидкости.

Внутримышечное введение чаще всего производят в мускулатуру бедра. Внутримышечно можно вводить до 5 мл жидкости. Прокол делают в освобожденный от волос и продезинфицированный участок кожи, чего нужно придерживаться и при внутрибрюшинном введении.

Внутрибрюшинное введение. Фиксированную крысу опускают вниз головой. Кожу живота каудальнее пупка берут в складку и у его основания прокалывают брюшную стенку, держа иглу перпендикулярно. В дальнейшем проводят иглу по ходу складки и производят инъекцию. Взятие брюшной

стенки живота в складку и введение иглы по направлению складки предохраняют от повреждения иглой внутренние органы. Внутривенно можно вводить крысам до 5 мл жидкости в левый нижний квадрант брюшной стенки.

Внутривенное введение. Внутривенные инъекции производят в боковую вену хвоста тонкой иглой. Животное фиксируют одним из описанных способов. Для расширения вен хвост протирают ваткой, смоченной теплой водой, или опускают в теплую воду (45— 55 °С). Место укола высушивают и дезинфицируют.

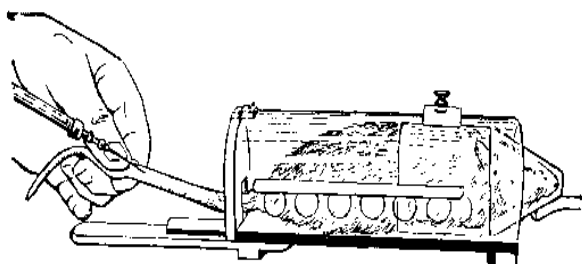
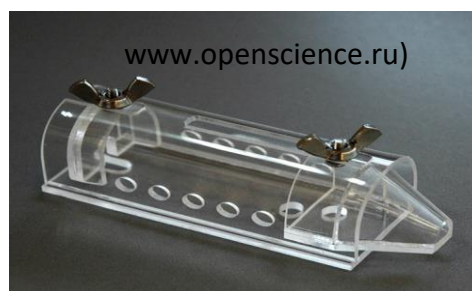


Рис.9. Введение жидкости в боковую вену хвоста крысы фиксированной в камере Когана (1978).



Современные фиксаторы (рестрейнеры) для лабораторных крыс

Хвост удерживают пальцами левой руки, а в правой держат шприц. Помощник сдавливает вену у корня хвоста. Прокол делают по возможности периферичнее, причем игла должна идти поверхностно по ходу вены. Если инъецированная жидкость не встречает сопротивления и в месте нахождения кончика иглы не отмечаются вздутия под кожей, то это указывает, что игла находится в сосуде (рис. 9). Внутривенное введение можно производить также в дорсальную вену полового члена.

Взрослым белым крысам внутривенно допустимо вводить до 6 мл жидкости.

Внутрисердечное введение. Пункция сердца описана ниже. Инъекцию следует проводить медленно. Внутрисердечно крысам допустимо вводить не более 1 мл жидкости.

Субоципитальное введение производят наркотизированным животным. Предварительно извлекают 0,1—9,2 мл спинномозговой жидкости. Допустимо

вводить 0,05—0,15 мл жидкости. Для проведения инъекций у крыс используют иглы толщиной 0,45 мм.

Выбор концентраций и доз химического соединения решается с учетом целей эксперимента и физиологических особенностей подопытных животных. Необходимо помнить, что количество вводимых растворов ограничивается рамками физиологических возможностей, массой и возрастом животных. Так, максимальные объемы введения у крыс составляют интраназально до 0,4 мл, ректально - 1 мл, внутрикожно - 0,04 мл, подкожно - 10 мл, внутримышечно и внутрибрюшинно - до 5 мл, внутривенно - 6 мл, внутрисердечно - 1 мл, субокципитально - 0,15 мл; интрагастральное введение физиологично до 3 мл - при весе тела 100-190 г; 200-290 г - 4-5 мл, 250-300 г - 6 мл, 300 г и более - 8 мл (не создавая нагрузки объемом).

Наркоз. Для длительного обездвиживания наркотизированных крыс привязывают к операционному столику или к специальному станку.

Ингаляционный наркоз у крыс с осторожностью можно проводить при помощи этилового эфира. Животное помещают под небольшой колпак, в камеру или эксикатор, куда кладут ватку, смоченную эфиром, и следят за наступлением наркоза. При помещении крыс (или мышей) в эксикатор или камеру для предотвращения удушья в них следует подавать воздух или кислород.

При выполнении операций на сердце, легких, аорте крысы должны находиться на искусственном дыхании и у них проводят эндотрахеальный наркоз. Техника интубации трахеи у мелких лабораторных грызунов (морских свинок, крыс и мышей), приспособления и устройства для ведения искусственного дыхания и эндотрахеального наркоза описаны А. Х. Коганом (1978).

Неингаляционный наркоз вызывают подкожным или внутрибрюшинным введением этаминала (внутрибрюшинно 40— 50 мг/кг), барбамила (подкожно — 50—80 мг/кг), хлоралгидрата (200—250 мг/кг) и других наркотиков.

Этаназия. Крыс умерщвляют хлороформом, эфиром, помещая их в небольшую закрытую посуду, или декапитацией, лучше и легче с помощью гильотины.

Способы взятия крови.

У крыс небольшое количество крови удается взять из ушных раковин. Для этого помощник левой рукой фиксирует крысу, крепко зажимая конечности, а большим и указательным пальцами натягивает кожу шеи, сдавливая сосуды этой области и создавая застой крови и гиперемия ушных раковин. Из ушной раковины возможны повторные заборы крови через 3—5 суток. Содержание эритроцитов, лейкоцитов и лейкоцитарная формула крови при повторных взятиях крови из ушной раковины крыс остается без изменений, в то время как при повторных взятиях крови после ампутации кончика хвоста из-за возникающей воспалительной реакции увеличивается число лейкоцитов.

Для забора крови из бедренной или яремной вен крыс подвергают наркозу.

Для получения больших количеств крови прибегают у взрослых крыс к пункции хвостовой вены. Хвост обогревают теплой водой, дезинфицируют вену сдавливают у корня хвоста, вводят в сосуд иглу и шприцем отсасывают кровь. Не редко для взятия крови обрезают кончик хвоста, после чего собирают кровь, вытекающую из раны. Из кончика хвоста удастся получить значительное количество крови вакуумно отсасывая ее. Однако, чтобы взять кровь из вен хвоста, не обязательно отрезать его кончик. Для этого достаточно острой бритвой сделать надрез кончика хвоста наискось, по спирали. Такая рана менее травматична, она быстро заживает.

Кровь из бедренной вены берут под наркозом. Вену отпрепаровывают, вскрывают. Из вскрытого сосуда кровь накапливается в ране. После взятия крови рану тампонируют и зашивают.

Весьма удобно брать кровь у крыс, а также у других мелких лабораторных животных из ретроорбитального венозного сплетения при помощи пастеровской микропипетки (кончик пипетки должен быть слегка заточенным и иметь в диаметре не более 1 мм).

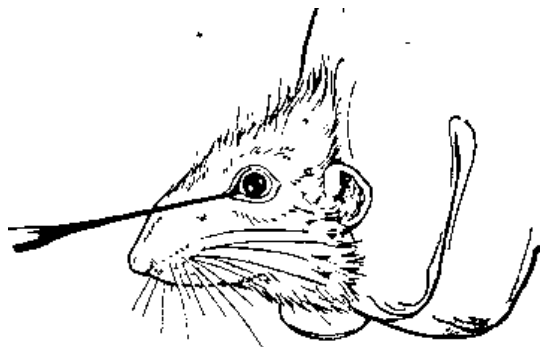


Рис.10. Взятие крови микропипеткой из ретроорбитального венозного сплетения крысы.

Для этого наркотизированную крысу захватывают левой рукой за кожу шеи большим и указательным пальцами, а другими пальцами надежно удерживают за кожу спины. Микропипетку берут в правую руку.

Концом пипетки пробурывающими движениями прокалывают конъюнктиву внутреннего угла глаза и проводят ее на глубину 1—2 мм за глазное яблоко, где находится венозное сплетение.

При правильном введении в капилляр микропипетки из ретроорбитального сплетения самотеком поступает кровь.

При необходимости взять, большое количество крови следует натянуть кожу в области шеи, чтобы сдавить яремные вены и создать венозный застой, т.е. повысить венозное давление в ретроорбитальном венозном сплетении (рис. 10). При взятии крови из венозного сплетения глазницы необходимо следить, чтобы в пипетку не попала слезная жидкость. Описанный способ прост, позволяет брать кровь при хронических наблюдениях. Редко возникают осложнения в виде повреждения глаза и его слепоты.

Пункция сердца. У наркотизированного животного выстригают шерсть в области предполагаемого укола и дезинфицируют кожу. Пальпаторно определяют место конечного толчка сердца. На 1 см краниальнее от установленной точки, отступив на 1—2 мм от левого края грудины, делают укол, держа иглу вертикально. Пункцией сердца у крупных крыс удается получить до 6—8 мл крови. При пункции сердца лучше пользоваться вакуумным методом отсасывания крови (Лущенко И.П. 1961). Пункцию проводят не чаще одного раза в неделю. После взятия крови подкожно вводят 0,9 %-й раствор хлорида натрия.

Опыты в условиях спонтанного диуреза и их оценка (сбор мочи).

Обычно создают группы крыс по 10-15 в каждой (но не менее 6) с более близким общим весом. Опыты над каждой группой можно ставить через день.

Функцию почек у крыс можно изучать путем сбора мочи в течение суток или 6 часов (*спонтанный диурез*) или в ближайшие часы (3-4 часа) после функциональной водно-солевой либо водной нагрузки (*водный диурез*) (Рябов С.И., Наточин Ю. В. 1997).

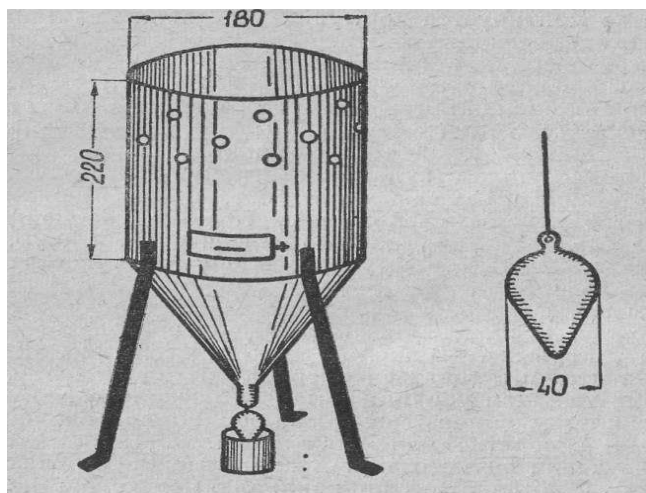


Рис.11.
*Индивидуальная
клетка для крысы.
Рядом показан
отделитель в
увеличенном
масштабе.*

В обоих случаях желательно помещать животных в индивидуальные обменные клетки, изготовление которых несложно. Клетки делают из алюминия или другого нержавеющей металла, а также из органического стекла и других пластмасс. В нашей лаборатории используются клетки, общий вид и размеры которых показаны на рисунке 11.

Крысу помещают на металлическую сетку с отверстиями шириной примерно 2 мм. (Слишком густая сетка может задерживать капельки мочи).

Чтобы препятствовать попаданию в мочу твердых частиц (кусочки пищи или кала) целесообразнее использовать различного типа отделители, один из которых показан на рисунке 11. Он представляет собой полый стеклянный шарик грушевидной (можно неправильной) формы, легко изготавливаемый стеклодувами. В верхней части делается отверстие или крючок для подвешивания с помощью тонкой проволоки, нижняя часть оттягивается, чтобы облегчить стекание мочи. Отделитель подвешивают к центру сетки, а под него ставят стаканчик для сбора мочи, стекающей по стенкам отделителя. При этом

твердые частицы отбрасываются в стороны. Разумеется, стаканчик не должен быть значительно шире отделителя, иначе моча будет загрязняться.

Для изучения мочевыделительной функции у крыс можно использовать также более современные метаболические клетки Рис.12.



Рис.12.

Результаты первых 2—3 экспериментов не учитываются, так как животные должны адаптироваться к новой обстановке.

При постановке экспериментов важно учитывать суточные, а также сезонные колебания показателей водно-солевого обмена (Пронина Н.Н.; Джигоев И.Г.). По нашим наблюдениям при различных погодных условиях (снег, дождь), температуре в виварии - колебания диуреза могут превосходить ожидаемые показатели в токсикологических экспериментах. По этой причине все сравниваемые группы животных рекомендуется сажать в клетки для экспериментов в одно время (разница в разные дни не должна составлять более получаса, в промежутки времени с 8⁰⁰ до 9⁰⁰) желательно весной (март-май) и осенью (сентябрь-ноябрь) (Джигоев И.Г. 2000). Статистически наиболее точные результаты были получены при постановке параллельных экспериментов (т.е. в один день, например: 10 крыс с введением тестируемого токсического вещества, 10 крыс с применением профилактического средства, и 6 крыс фон). Через день опыты следует дублировать в тех же группах животных (если динамика изменений диуреза подтверждается, содержание веществ экскретируемых с мочой второй раз можно не определять без ущерба для результатов статистических расчетов).

Опыты с функциональной водной нагрузкой и их оценка.

При изучении различных влияний на функцию почек часто пользуются водной нагрузкой для повышения уровня мочеотделения. Особенно широко используют введение в организм жидкости при изучении количественных показателей функции почек, когда особое значение приобретает точный сбор мочи в течение относительно небольшого периода времени. Кроме того, нередко исследователь пытается выяснить действие какого-либо фактора (например, лекарственного вещества) на способность почки развивать диурез после водной нагрузки (водный диурез).

Для водной нагрузки используют воду или слабосолевые растворы, которые вводят путем естественного питья или с помощью желудочного зонда. Нередко пользуются также введением изотонического раствора хлорида натрия внутривенно.

Следует отметить, что на выраженность водного диуреза большое влияние оказывают как состав даваемой жидкости, так и способ ее введения.

Известно, что наибольший диурез вызывает чистая вода, солевые растворы выделяются тем медленнее, чем ближе их концентрация к изотонической (А.М. Зимкина и А. А. Михельсон 1932).

Определенное значение для диуреза имеет путь введения воды. Наибольшая величина мочеотделения наблюдается при естественном питье, тогда как при внутривенном, а тем более подкожном введении собакам и кроликам диурез оказывается более вялым (Д. Баркрофт, 1937; Е. Б. Берхин, 1956; Epstein, 1929, и др.). При использовании желудочного зонда диурез оказывается несколько сниженным, особенно в самом начале (Е. Б. Берхин, 1956); правда, последнее в большинстве случаев не имеет существенного значения для экспериментатора. Если пользуются зондом, первые опыты не должны учитываться, так как животное должно привыкнуть к процедуре.

Можно рекомендовать следующий ход опыта с водным диурезом.

Крысу в течение 2 часов до эксперимента лишают воды и корма (если проводят серийные опыты, желательна более или менее постоянная диета,

накануне опыта следует проследить за дачей воды во избежание водного дефицита), затем дается водная нагрузка, для чего воду (обычно в количестве примерно 5 мл на 100 г. веса) вводят через рот с помощью надетого на шприц эластического катетера или слегка изогнутого металлического зонда с затупленным концом. Для этого крысу берут левой рукой (начинающие нередко пользуются кожаной перчаткой и держат на весу, а правой рукой осторожно вводят зонд, стараясь не поранить слизистую и не попасть в трахею). Если первые капли воды проходят свободно (и крыса не чихает), то вводят остальное количество. Диурез регистрируют ежечасно в течение трех (реже четырех) часов.

Жидкость для в/ж введения предварительно нагревают до температуры 25—30°. В жаркое время года можно давать воду комнатной температуры. Водопроводная вода должна некоторое время перед экспериментом постоять в лаборатории.

После введения водной нагрузки крыс сажают в метаболические клетки. Регистрация мочеотделения ведется в специальном протоколе.

Обычно животные быстро привыкают к процедуре, и водный диурез, сначала несколько заторможенный, достигает через 3—4 опыта постоянных величин. При даче упомянутых выше количеств воды водный диурез составляет за 3 часа 70—80% от введенного количества. Животных, которые за 3 часа выделяют менее 50% введенной жидкости, мы обычно исключаем из опытов, разумеется, за исключением того случая когда такой результат мог быть продиктован условиями эксперимента.

Низкий водный диурез может зависеть от нарушения водно-солевого баланса, вследствие случайного заболевания (лихорадка, жидкий стул и т. д.) или же от нарушений при подготовке опыта (крыса недавно ела или накануне не пила).

При оценке опытов с водной нагрузкой следует иметь в виду, что, водный диурез представляет собой сложную рефлекторную реакцию, которая начинается уже за счет раздражений рецепторов переднего отдела

пищеварительного тракта и продолжается благодаря импульсам из внутренних сред организма (Е. Б. Берхин 1957; Н. Н. Пронина 1957; М. Л. Линецкий 1960 и др.). Выраженность этой реакции, естественно, зависит от функционального состояния нервных центров и других звеньев нейро-гормональной регуляции почек. Вот почему влияние различных факторов на водный диурез не является еще доказательством их действия на функцию самих почек.

По упомянутой причине опыты с водным диурезом особенно чувствительны к различным внешним влияниям, в чем мы неоднократно убеждались. При работе с водным диурезом следует учитывать также и те изменения почечной функции, которые возникают после приема избыточной жидкости. Помимо общеизвестного факта резкого угнетения канальцевой реабсорбции воды, чем обычно и объясняют подъем диуреза, показано также усиление клубочковой фильтрации (Берхин Е. Б., 1955; Пронина П. Н., 1955; Valfit et al., 1957; и др.). Установлено что водная нагрузка сопровождается и увеличением почечного кровотока (Е. Б. Берхин, 1959, 1962; Kerr 1958). Таким образом, при изучении деятельности почек на фоне водного диуреза исследователь имеет дело уже со значительно измененной функцией. В некоторых случаях это является нежелательным и заставляет ограничиться опытами с так называемым спонтанным диурезом.

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ВОДОВЫДЕЛИТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ ПОЧЕК.

Основные процессы мочеобразования. Диурез, скорость клубочковой фильтрации воды, канальцевая реабсорбция воды.

Для измерения объема клубочковой фильтрации используют хорошо растворимые в воде, физиологически инертные вещества, не токсичные, не подвергающиеся секреции и реабсорбции в нефроне, но свободно проникающие из плазмы крови с фильтруемой жидкостью в той же концентрации, в которой они содержатся в плазме (Rehberg P., 1926; Smith H., 1951; Тареев Е. М., 1958; Гинецинский А. Г., 1959) (рис. 13).

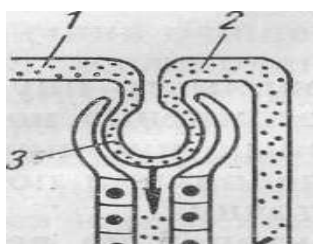


Рис. 13. Схема, поясняющая принцип определения клубочковой фильтрации по очищению от иулина (C_{in}) или креатинина (C_{Cr}). 1 и 2 — афферентная и эфферентная артериолы; 3 — клубочек. Черные точки — иулин или креатинин в плазме крови сосудов и в профильтрованной жидкости; стрелка — направление движения поступившего в каналец с ультрафильтратом иулина или креатинина

Профильтрованная вода постепенно всасывается в канальцах вместе с биологически ценными для организма веществами, объем жидкости уменьшается, а концентрация вещества, используемого для определения фильтрации, пропорционально возрастает.

Так как все количество данного вещества выделяется с мочой $U_x V$, то очевидно, что правомочно равенство профильтрованного и экскретированного вещества:

$$C_x P_x = U_x V,$$

где C_x — объем жидкости, профильтрованной в клубочке (мл/час/100г), P_x — концентрация в плазме крови (соответственно и в ультрафильтрате) вещества x , используемого для определения объема фильтрации, U_x — концентрация этого вещества в моче, V — уровень мочеотделения (мл/час/100г для крыс в эксперименте). Для определения клубочковой фильтрации используют такие вещества, как иулин (полимер фруктозы), маннитол, ЭДТА, тиосульфат, а из эндогенных веществ наиболее удобным оказался *креатинин*. В

случае инулина (in) или креатинина (Cr) формулы для расчета клубочковой фильтрации будут иметь вид:

$$C_{Cr} = \frac{U_{Cr} * V}{P_{Cr}}, \quad C_{in} = \frac{U_{in} * V}{P_{in}}$$

Впервые для определения фильтрации Ребергом был предложен креатинин — нормальный компонент плазмы (Rehberg, 1926), в связи с чем, такое определение нередко называют пробой Реберга.

Очищение от креатинина в условиях патологии в ряде случаев значительно отличается от клиренса инулина, поскольку креатинин может выделяться и за счет канальцевой секреции. В то же время простота метода и сравнительно важное значение получаемых результатов делают этот метод весьма ценным.

По разности между объемами профильтровавшейся в 1 час жидкости и выделенной мочи легко вычислить объем реабсорбированной воды и выразить его в процентах к фильтрации (R%).

$$R_{H_2O} = F - V, \quad (\text{мл/час/100г}) \quad (\text{абсолютная канальцевая реабсорбция воды})$$

$$R \% = \frac{F - V}{F} * 100 \quad \% \quad (\text{относительная канальцевая реабсорбция воды})$$

Определение креатинина в моче и плазме крови.

В качестве унифицированного утвержден метод, основанный на реакции Яффе (метод Поппера)

(*Popper H., Mcmdel Mayer H. 1937; Колб В.Г., Камышников В.С. 1982*)

Принцип. Креатинин реагирует с пикриновой кислотой в щелочной среде с образованием окрашенных соединений.

Реактивы.

1. Пикриновая кислота, насыщенный раствор. Товарная пикриновая кислота содержит 15—20 % влажности: кислоту не сушить! Взрывоопасно! В 100 мл воды растворяют 2 г пикриновой кислоты при нагревании в горячей бане. После этого раствор оставляют стоять на 24 ч, периодически перемешивая. Затем раствор фильтруют. Реактив стабилен. Хранят в темной посуде.

2. HCl, 0,1 моль/л.

3. Основной калибровочный раствор креатинина, 10ммоль/л: 113,1 мг креатинина доводят до 100 мл 0,1 моль/л раствором HCl. Хранят в холодильнике в посуде с притертой пробкой. Для определения креатинина в сыворотке крови рабочий калибровочный раствор получают разведением основного раствора водой в 100 раз; 1 мл раствора содержит 0,1 ммоль креатинина.

4. Натр едкий, 2,5 моль/л.

Материал для исследования. Сыворотка крови, моча. В качестве консервантов для мочи можно использовать тимол и толуол.

Ход определения.

Определение креатинина в сыворотке крови:

2 мл сыворотки смешивают с 6 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты. Через 5 мин пробирку помещают на 15—20 с в кипящую водяную баню, затем центрифугируют. К 4 мл центрифугата добавляют 0,2 мл 2,5 моль/л раствора едкого натра и тщательно смешивают. Иногда после подщелачивания раствор мутнеет вследствие выпадения фосфатов. В этом случае раствор еще

раз центрифугируют. Затем раствор доводят до объема 10 мл водой. Через 10 мин (не позже 20 мин) измеряют в кювете с толщиной слоя 2 см при длине волны 500—560 нм (зеленый светофильтр) против холостой пробы.

Холостая проба: 3 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты и 0,2 мл 2,5 моль/л раствора едкого натра доводят до объема 10 мл водой. Расчет производят по калибровочному графику.

Построение калибровочного графика: из рабочего калибровочного раствора креатинина готовят разведения, как указано ниже в таблице 3. Через 10 мин производят измерения при тех же условиях, что и опытные пробы. Калибровочная кривая линейна до 260 мкмоль/л креатинина.

№ пробирки	Рабочий калибровочный раствор креатинина, мл	Раствор пикриновой кислоты, мл	2,5 моль/л раствор едкого натра, мл	Дистиллированная вода, мл	Концентрация креатинина в пробе, мкмоль/л
1	0,4	3,0	0,2	До объема 10 мл	40
2	0,8	3,0	0,2		80
3	1,6	3,0	0,2		160
4	2,4	3,0	0,2		240
5	3,2	3,0	0,2		320

Таблица 3.

Концентрация креатинина в сыворотке крови относительно постоянна, мало зависит от пола, возраста, диеты, и связано это с тем, что образование креатинина как конечного продукта метаболизма креатина в мышцах относительно постоянно. Это является важным условием для исследования клиренса эндогенного креатинина как меры клубочковой фильтрации.

Определение креатинина в моче. В мерной колбе или цилиндре вместимостью 100 мл смешивают 0,5 мл мочи (из всего количества) с 3 мл раствора пикриновой кислоты. Смесь тщательно встряхивают и добавляют 0,2 мл 2,5 моль/л раствора едкого натра. Выдерживают при комнатной температуре в течение 10 мин. Доводят объем до 100 мл водой. Измеряют на фотометре в

кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 500—600 нм (зеленый светофильтр) против холостой пробы.

Холостая проба: 3 мл раствора пикриновой кислоты и 0,2 мл 2,5 моль/л раствора едкого натра доводят водой до объема 100 мл.

Расчет производят по формуле при сравнении с калибровочной пробой.

Калибровочная проба. К 0,5 мл основного калибровочного раствора прибавляют 3 мл раствора пикриновой кислоты и 0,2 мл 2,5 моль/л раствора едкого натра. Далее пробы обрабатывают так же, как опытные.

$$K = \frac{C_k * E_{оп}}{E_k}$$

где K — количество креатинина в моче, мкмоль,
 C_k — количество креатинина в калибровочной пробе,
 $E_{оп}$ — экстинкция опытной пробы,
 E_k — экстинкция калибровочной пробы

Воспроизводимость. Коэффициенты вариации составляют 5—6 %.

Суточное выделение креатинина для каждой особи — величина относительно постоянная, которая зависит главным образом от массы мышечной ткани и мало зависит в отличие от мочевины от питания. Содержание креатинина в сыворотке крови уменьшается с возрастом.

Определение белка в моче и плазме крови.

Для определения общего белка в сыворотке (плазме) крови в качестве унифицированного используется *колориметрический биуретовый метод* (Колб В.Г., Камышников В.С., 1982, на стр. 30). Метод характеризуется высокой аналитической надежностью, его рассматривают в качестве референтного и рекомендуют для сравнения с другими аналитическими методами (Dilena В.А., Penberty L.А., Fraser С.С. 1983).

Принцип. Белки сыворотки (плазмы) крови, реагируя в щелочной среде с сернокислой медью, образуют соединения, окрашенные в фиолетовый цвет.

Реактивы.

1. Раствор хлористого натрия. 0,9 г NaCl растворяют в 100 мл дистиллированной воды.
2. 0,2 н раствор едкого натра, освобожденный от углекислого газа. 20 мл 1 н раствора NaOH доводят до объема 100 мл прокипяченной дистиллированной водой.
3. Биуретовый реактив. 4,5 г сегнетовой соли ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_4$) растворяют в 40 мл 0,2 н NaOH. После растворения прибавляют 1,5 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 0,5 г KJ. Раствор доводят до 100 мл 0,2 н NaOH. Его следует хранить в темном месте (или в посуде из темного стекла). Реактив пригоден около месяца.
4. 0,5 % раствор йодистого калия в 0,2 н растворе едкого натра. 0,5 г KJ растворяют в 100 мл 0,2 н NaOH. Хранить в посуде из темного стекла не более двух недель.
5. Рабочий раствор биуретового реактива. 20 мл биуретового реактива (3) смешивают с 80 мл раствора KJ (4). Хранить в темном месте не более двух недель.
6. Стандартный раствор альбумина (из человеческой или бычьей сыворотки). 1,0 г альбумина растворяют (в небольшом цилиндре или точной мерной пробирке) в 6—7 мл физиологического раствора NaCl с последующим доведением им до конечного объема 10 мл. 1 мл стандартного раствора содержит 0,1 г белка (100 г/л).

Ход определения. К 5 мл рабочего раствора биуретового реактива добавляют, избегая образования пены, 0,1 мл сыворотки крови.

Через 30 мин, самое позднее через 1 ч, пробу колориметрируют на ФЭКе в кювете с шириной слоя 10 мм при зеленом светофильтре (с максимумом пропускания 500 нм, лучше 546 нм). Показатели экстинкции учитывают в сравнении с таковыми контрольной пробы, которую готовят путем доливания к 5 мл рабочего раствора биуретового реактива 0,1 мл реактива 1 (практически раствор NaCl можно и не добавлять). Расчет ведут по калибровочной кривой.

Для построения калибровочного графика из основного стандартного раствора белка (реактив 6) готовят рабочие стандартные растворы, как указано в табл. 4 (0,1 мл основного стандартного раствора содержит 0,01 г белка). Из каждого разведения берут по 0,1 мл рабочего раствора и вносят в пробирки, содержащие по 5,0 мл рабочего биуретового реактива. Через 30—60 мин измеряют оптическую плотность стандартных проб, учитывая экстинкцию контрольной пробы (см. ход определения).

Калибровочную кривую можно строить лишь тогда, когда будет уверенность в том, что метод достаточно налажен. При этом для каждой концентрации стандартного раствора нужно сделать не менее 3-5 (обычно 5-10) определений. Всего этим методом исследуют 2-3 серии стандартных окрашенных растворов.

Табл. 4. Данные к построению калибровочного графика для определения общего белка сыворотки крови.

№ про бирок	Стандартный раствор белка (100 г/л) (мл).	Физиологический раствор NaCl (мл).	Содержание белка в пробе (г)	Концентрация белка (г/л)
1	0,4	0,6	0,04	40,0
2	0,6	0,4	0,06	60,0
3	0,8	0,2	0,08	80,0
4	1,0	-	0,10	100,0

При построении калибровочной кривой серию стандартных растворов обрабатывают так же, как и опытные пробы. Измерения оптической плотности стандартных растворов начинают с растворов наименьшей концентрации.

Средние значения оптической плотности (соответствующие различным концентрациям) наносят на миллиметровую бумагу. На оси абсцисс (горизонтальной) с соблюдением одинаковых интервалов равномерно *откладывают* значения концентрации стандартных растворов белка; на оси ординат (вертикальной) — соответствующие им величины оптической плотности. Масштаб выбирают так, чтобы кривая располагалась под углом 45°. Затем хорошо отточенным карандашом наносят среднее значение экстинкции из нескольких определений и через полученные точки (а кое-где и между ними) проводят прямую линию. При этом *удобно* пользоваться прозрачной линейкой. Если точка значительно выходит за пределы линии, то пробы переделывают.

При оценке результатов, чтобы каждый раз не восстанавливать и не опускать перпендикуляры к оси ординат (оптической плотности) *и* к оси абсцисс, (*концентраций*), составляют таблицу пересчета (градуировочную таблицу или калибровочный график), в которой напротив наиболее часто встречающихся значений экстинкций приводят соответствующие величины концентрации.

Калибровочную кривую нужно время от времени проверять. При этом не имеет смысла все точки строить заново. Достаточно взять несколько растворов известной концентрации белка и посмотреть, укладываются ли соответствующие им точки на прежней калибровочной кривой. Если это так, то кривую не переделывают.

Отечественной промышленностью налажен выпуск наборов реактивов для исследования концентрации общего белка в сыворотке крови по биуретовой реакции фирмы ООО «Агат-мед».

Определение общего белка в моче - одно из наиболее частых лабораторных исследований. Несмотря на массовость анализа и кажущуюся простоту исследования, корректное определение белка в моче является сложной задачей. Трудности ее решения обусловлены рядом причин: присутствием в моче химических соединений и лекарств, искажающих результаты анализа; малым содержанием белка в моче, часто не определяемым низкочувствительными

методами; нестабильным белковым составом мочи при различных заболеваниях. При этом оценка величины патологической протеинурии зависит от специфичности используемых методов к различному спектру уропротеинов. Определение общего белка является некоторым компромиссом, так как не существует метода, который позволил бы определить весь спектр уропротеинов.

Для определения в моче в качестве унифицированного **принят метод с сульфосалициловой кислотой**. (Рябов С.И., Наточин Ю.В., Бондаренко Б.Б. 1979, на стр. 31). Для анализа данным методом необходим объем 1 мл исследуемого материала мочи, что может быть затруднительно для определения общего белка в моче у мелких лабораторных животных в условиях спонтанного диуреза. Можно использовать смешивание проб мочи от нескольких животных, но это приводит к увеличению ошибки.

Для определения общего белка в моче можно использовать также **биуретовый метод** (Рябов С.И., Наточин Ю.В., Бондаренко Б.Б. 1979), но для анализа необходимы большие объемы мочи (5 мл) что затрудняет применение метода в эксперименте на крысах.

Метод количественного определения общего белка в моче **по методу Лоури** (Северин С.Е., Соловьева Г.А. 1989.) основан на образовании окрашенных продуктов ароматических аминокислот с реактивом Фолина в сочетании с биуретовой реакцией на пептидные связи. Данный метод характеризуется высокой чувствительностью (10—100 мкг белка в пробе), но обладает рядом существенных недостатков (Колб В.Г., Камышников В.С., 1982) обусловленных, прежде всего малой специфичностью (свободные ароматические аминокислоты и некоторые иные соединения образуют с реактивом Фолина комплексы характерной окраски) и сложностью приготовления основного реагента.

На развитие окраски влияет большое количество веществ: компоненты буферных систем (трис-буфер в концентрации 0,2 мМ, глицилглицин), восстановители (цистеин, дитиотреитол в концентрации 0,01—0,4 мМ, аскорбиновая кислота), комплексоны (ЭДТА в концентрации 0,5 мМ), детергенты (тритон X-100 в концентрации 0,1—0,2% вызывает выпадение

осадка), сернокислый аммоний в концентрации 0,15%, сахара в концентрации 10% и др.

В связи с этим при построении калибровочного графика для определения белка по Лоури в растворитель для стандартного белка необходимо включать все компоненты, содержащиеся в анализируемых пробах. В некоторых случаях целесообразно предварительное осаждение белков из растворов, например трихлоруксусной кислотой, с последующим растворением их в щелочных растворах, или очистка белковых растворов от низкомолекулярных компонентов путем диализа или гельфильтрации на сефадексе G-25.

Данные литературы и результаты собственных исследований указывают на то, что при определении концентрации белка в моче предпочтение следует отдавать методу, основанному на использовании индикатора **пирогаллолового красного (Pyrogallol Red)** (Ким Ю.В., Шибанов А.Н. 2004; Козлов А. В. 2008). Пирогаллол - красный - молибдатный комплекс в кислой среде взаимодействует с белками с образованием окрашенных комплексов, имеющих максимум поглощения при 600 нм. Комплекс устойчив к воздействию многих соединений, в том числе лекарственных препаратов, солей, оснований, кислот.

Метод с пирогаллоловым красным в настоящее время активно внедряется в практику ведущих клинико-диагностических лабораторий, имеет очень высокую чувствительность, существенно превышающую чувствительность определения белка другими методами. Метод с **ПГК** имеет чувствительность почти в 3 раза выше, чем Турбидиметрический с 3% сульфосалициловой кислотой, позволяет определять меньшие концентрации белка. Его линейная область определения колеблется при использовании наборов разных фирм от 1,5 до 4,0 г/л, а чувствительность - от 0,01 до 0,05 г/л.

*Для количественного определения белка в моче разработаны и выпускаются наборы реагентов для колориметрического определения белка в моче с пирогаллоловым красным «Белок-ПГК-Ново» фирмой ЗАО «Вектор-Бест», а так же зарубежные фирмы «Bayer Diagnostics», «Beckman», «Biodirect», «Biocon Diagnostik» и другие. Поскольку пограничной концентрацией белка в моче между нормой и патологией для турбидиметрического метода с 3% сульфосалициловой кислотой ниже, чем для метода с **ПГК**, это необходимо учитывать при налаживании в клинико-диагностических лабораториях нового для России метода определения общего белка в моче с пирогаллоловым красным и при интерпретации получаемых количеств белка в условиях нормы и патологии (Пупкова В.И., Прасолова Л.М. Метод с пирогаллоловым красным - альтернатива традиционным методам определения белка в моче //Клиническая лабораторная диагностика, 2010.-N 6.-С.17-21.)*

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ЭЛЕКТРОЛИТОВЫДЕЛИТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ ПОЧЕК.

Показатели почечной обработки основных электролитов – Na, K, Ca. (фильтрационный заряд, канальцевая реабсорбция, экскреция катионов)

Зная скорость клубочковой фильтрации, мы можем рассчитать фильтрационно-реабсорбционную функцию почек по отношению ко многим веществам, например натрию, кальцию. Если содержание данного вещества в 1 мл плазмы P_x , а фильтрация (в мл/час/100г веса крыс) — F , то количество профильтрованного вещества F_x , выражается формулой

$$F_x = K_x \cdot P_x \cdot F$$

K_x – коэффициент ультрафильтрации Доннана:

Согласно равновесию Доннана небольшое различие концентраций ионов по обе стороны мембраны обусловлено тем, что в плазме крови присутствуют анионы, не диффундирующие через мембрану и удерживающие часть катионов. Константа Доннана для Na и K = 0,95; для Ca = 0,65.

Количество профильтрованного в единицу времени (например, в 1 час) катиона (**Na, K** либо **Ca**) называется его фильтрационным зарядом.

Количество реабсорбированного вещества R_x равно разности между количеством профильтрованного и выделенного с мочой. Подставляя вместо F_x его значение, получаем

$$R_x = K_x P_x F - U_x V,$$

где U_x — содержание вещества в 1 мл мочи.

Реабсорбцию вещества в процентах к профильтрованному — $R_x\%$ легко вычислить по формуле

$$R_x\% = \frac{R_x}{F_x} * 100 = \frac{K_x P_x F - U_x V}{K_x P_x F} * 100$$

Такой метод используют для вычисления реабсорбции натрия и кальция, а также некоторых лекарственных веществ, за исключением секретлируемых, как, например, *калия*. Некоторые авторы предлагают способы вычисления отдельно дистальной реабсорбции натрия. Эти расчеты, однако, связаны с допущениями, которые не полностью удовлетворяют требованиям научной строгости, а потому могут с известной осторожностью применяться только для клинических целей (Наточин Ю.В. 1979).

Определение натрия и калия в моче и плазме крови методом пламенной фотометрии.

Определение электролитов методом пламенной фотометрии характеризуется высокой надежностью, чувствительностью, простотой, и быстротой выполнения (в течение нескольких минут) и считается референтным методом (унифицированным) для определения натрия и калия в биологических жидкостях (плазма крови, моча, эритроциты, кислотные экстракты из тканей и др.) (Руммель А.Г., Баженова А.Ф. 1967; Меньшиков В.В. 2007).

Особое преимущество данного метода заключается в том, что он требует минимальных количеств исследуемого материала для проведения анализа, что особенно важно при работе с мелкими лабораторными животными (крысы, мыши, хомяки).

Опасность работы с горючими и взрывоопасными газами и системами все чаще приводит к замене этих приборов (Меньшиков В.В. 2007) микроанализаторами ионов с ионоселективными электродами (несмотря на то, что потенциометрический метод обладает меньшей точностью).

Принцип. В основу работы фотометра положен эмиссионный метод фотометрии пламени. Раствор исследуемого элемента в виде аэрозоля вводится в пламя. Под действием тепловой энергии пламени возникает характерный для данного элемента спектр излучения. (*Калий придает слабое красно-фиолетовое окрашивание пламени газовой горелки, а натрий ярко-желтое (589 нм)*). Аналитическая линия этого излучения выделяется интерференционным светофильтром и воспринимается фотоприемником, электрический сигнал которого пропорционален количеству исследуемого элемента. Усиленный и обработанный сигнал с фотоприемника выводится на цифровое табло и регистрируется.

(В низкотемпературном пламени ($+ 1200^{\circ} \text{C}$: пропан-бутан используемый на кафедре) практически возбуждаются лишь атомы щелочных и щелочноземельных металлов. В высокотемпературном пламени ($+2300^{\circ} \text{C}$: смесь ацетилен-кислород воздуха; $+2500\text{—}2700^{\circ} \text{C}$: водород-кислород и $+ 3000\text{—}3500^{\circ} \text{C}$: ацетилен-кислород) возбуждаются также атомы ряда тяжелых металлов.)

Подготовка биологического материала к анализу.

Определение натрия и калия можно проводить как в сыворотке, так и в плазме крови. Если электролиты определяют в плазме, то в пробирку добавляется антикоагулянт — гепарин литий. Другие антикоагулянты при взятии крови для измерения уровня натрия и калия не подходят, так как солевые антикоагулянты, изменяя осмотическую концентрацию среды, вызывают разведение плазмы. Некоторые препараты гепарина содержат много натрия, тогда надо вводить на него поправку.

При нарушении техники взятия крови могут повреждаться мембраны клеток (гемолиз), что приводит к завышению истинной концентрации калия в плазме. На результатах определения уровня натрия гемолиз сколь-нибудь существенно не сказывается, так как концентрация этого элемента внутри клеток намного ниже, чем в плазме. Поскольку гемоглобин, выходящий в сыворотку (плазму) при гемолизе, окрашивает ее в красный цвет, гемолизированные пробы легко выявляются. Причинами гемолиза являются слишком сильное сдавление вены при взятии крови, чрезмерно энергичное встряхивание пробирки или сильное охлаждение крови. Гемолизированные образцы нельзя использовать для определения уровня калия.

Плазму для определения уровня калия необходимо отобрать не позднее 1 часа после взятия крови. Через несколько часов хранения в сыворотке (плазме) существенно возрастает содержание калия. Это объясняется тем, что после взятия крови для поддержания нормальной работы в ней натриево-калиевой помпы используются запасы энергии глюкозы. Через какое-то время они полностью расходуются, и насос перестает работать. В результате калий начинает выходить из клеток в плазму, что является причиной искажения результатов определения уровня калия.

Для используемого нами прибора ФПА-2 диапазон определяемых концентраций химических элементов в пробах (чувствительность) составляет:

Na –	0,5-23 мг/л;	0,0217487-1 ммоль/л (мкмоль/мл)
K –	0,2-40 мг/л;	0,0051-1,023 ммоль/л (мкмоль/мл)

Натрий

выбор концентраций рабочих стандартов, разведение биологического материала
 (число градуировочных точек может быть от одной до пяти (согласно инструкции к пламенному фотометру ФПА-2)).

Na мкмоль/мл плазма крови исх. конц.	разведен. разведенн. проб (град. точка)	Na мкмоль/мл конц.	Na мкмоль/мл моча спонт/д исх. конц.	разведен. разведенн. проб (град. точка)	Na мкмоль/мл моча спонт/д исх. конц.	разведен. разведенн. проб (град. точка)	Na мкмоль/мл моча водн/д исх. конц.	разведен. разведенн. проб (град. точка)	Na мкмоль/мл моча водн/д исх. конц.	разведен. разведенн. проб (град. точка)		
10	200	0,05	10	200	0,05	400	1	20	0,05			
20		0 , 1	20		0 , 1		120		0 , 3		2	0 , 1
30		0,15	30		0,15		130		0,325		3	0,15
40		0,2	40		0,2		140		0,35		4	0,2
50		0,25	50		0,25		150		0,375		5	0,25
60		0 , 3	60		0 , 3		160		0,4		6	0 , 3
70		0,35	70		0,35		170		0,425		7	0,35
80		0,4	80		0,4		180		0,45		8	0,4
90		0,45	90		0,45		190		0,475		9	0,45
100		0 , 5	100		0 , 5		200		0 , 5		10	0 , 5
110		0,55	110		0,55		210		0,525		11	0,55
120		0,6	120		0,6		220		0,55		12	0,6
130		0,65	130		0,65		230		0,575		13	0,65
140		0 , 7	140		0 , 7		240		0,6		14	0 , 7
150		0,75	150		0,75		250		0,625		15	0,75
160		0,8	160		0,8		260		0,65		16	0,8
170		0,85	170		0,85		270		0,675		17	0,85
180		0 , 9	180		0 , 9		280		0 , 7		18	0 , 9
190		0,95	190		0,95		290		0,725		19	0,95
200		1	200		1		300		0,75		20	1
				310	0,775							
				320	0,8							
				330	0,825							
				340	0,85							
				350	0,875							
				360	0 , 9							
				370	0,925							
				380	0,95							
				390	0,975							
				400	1							

Разведения могут быть и другими в зависимости от чувствительности прибора (Меньшиков В.В. 2007).

Калий

выбор концентраций рабочих стандартов, разведение биологического материала
(число градуировочных точек может быть от одной до пяти (согласно инструкции к пламенному фотометру ФПА-2)).

К (мкмоль/мл) плазма крови исх. конц.	разведен-	К	К (мкмоль/мл) конц. разведенн. проб (град. точка)	К (мкмоль/мл) конц. разведенн. проб (град. точка)	К (мкмоль/мл) конц. разведенн. проб (град. точка)	К (мкмоль/мл) конц. разведенн. проб (град. точка)	К (мкмоль/мл) конц. разведенн. проб (град. точка)	К (мкмоль/мл) конц. разведенн. проб (град. точка)	К (мкмоль/мл) конц. разведенн. проб (град. точка)	К (мкмоль/мл) конц. разведенн. проб (град. точка)	К (мкмоль/мл) конц. разведенн. проб (град. точка)	К (мкмоль/мл) конц. разведенн. проб (град. точка)	К (мкмоль/мл) конц. разведенн. проб (град. точка)	К (мкмоль/мл) конц. разведенн. проб (град. точка)	
		мкмоль/10мл мкмоль/сл (санти литр)													мкмоль/мл моча спонт/д исх. конц.
1	200	0,005	0,05	10	0,05	110	0,275	1	0,05	2	0,05	10	0,05	1	0,05
2		0,01	0,1	20	0,1	120	0,3	2	0,1	11	0,1	20	0,1	2	0,1
3		0,015	0,15	30	0,15	130	0,325	3	0,15	12	0,15	30	0,15	3	0,15
4		0,02	0,2	40	0,2	140	0,35	4	0,2	13	0,2	40	0,2	4	0,2
5		0,025	0,25	50	0,25	150	0,375	5	0,25	14	0,25	50	0,25	5	0,25
6		0,03	0,3	60	0,3	160	0,4	6	0,3	15	0,3	60	0,3	6	0,3
7		0,035	0,35	70	0,35	170	0,425	7	0,35	16	0,35	70	0,35	7	0,35
8		0,04	0,4	80	0,4	180	0,45	8	0,4	17	0,4	80	0,4	8	0,4
9		0,045	0,45	90	0,45	190	0,475	9	0,45	18	0,45	90	0,45	9	0,45
10		0,05	0,5	100	0,5	200	0,5	10	0,5	19	0,5	100	0,5	10	0,5
11		0,055	0,55	110	0,55	210	0,525	11	0,55	20	0,55	110	0,55	11	0,55
12		0,06	0,6	120	0,6	220	0,55	12	0,6	21	0,6	120	0,6	12	0,6
13		0,065	0,65	130	0,65	230	0,575	13	0,65	22	0,65	130	0,65	13	0,65
14		0,07	0,7	140	0,7	240	0,6	14	0,7	23	0,7	140	0,7	14	0,7
15		0,075	0,75	150	0,75	250	0,625	15	0,75	24	0,75	150	0,75	15	0,75
16		0,08	0,8	160	0,8	260	0,65	16	0,8	25	0,8	160	0,8	16	0,8
17		0,085	0,85	170	0,85	270	0,675	17	0,85	26	0,85	170	0,85	17	0,85
18		0,09	0,9	180	0,9	280	0,7	18	0,9	27	0,9	180	0,9	18	0,9
19		0,095	0,95	190	0,95	290	0,725	19	0,95	28	0,95	190	0,95	19	0,95
20		0,1	1	200	1	300	0,75	20	1	29	1	200	1	20	1
					310	0,775			30						
					320	0,8			31						
					330	0,825			32						
					340	0,85			33						
					350	0,875			34						
					360	0,9			35						
					370	0,925			36						
					380	0,95			37						
					390	0,975			38						
					400	1			39						

Соответственно исследуемые пробы плазмы **крови** разводятся дистиллированной водой для определения натрия **не менее** 200 раз, а для калия от 20 до 200 раз (более практично одинаковое разведение в 200 раз). Пробы **мочи** разводятся в 20, 200, 400 раз (Таб.6,7,8)

Таблица № 8

Разведения проб для анализа плазмы и мочи	Ед. изм.	Плазма крови (опр. Na)	Плазма крови (опр. K)	моча спонт. диурез (опр. Na)	моча спонт. диурез (опр. K)	моча водн. диурез (опр. Na)	моча водн. диурез (опр. K)
Объем мочи	мл	0,05	0,05	0,05	0,05	0,25	0,25
Бидистиллир вода	мл	10 (9,95)	10 (9,95)	10 (9,95)	10 (9,95)	4,75	4,75
Полученное разведение		200	200	200	200	20	20

Используемый в нашей лаборатории **фотометр пламенный автоматический ФПА-2** позволяет определять одновременно натрий и калий, а также выводить на табло результаты измерения в виде концентрации (мкг/мл или мкмоль/мл). Необходимо отметить, что наиболее верные результаты на данном фотометре были получены при **раздельном, прямом** определении концентраций натрия и калия.

Такое прямое измерение является эффективным при условии, что правильно приготовлен комплексный калибровочный раствор, который одновременно содержит и натрий и калий в концентрациях близких тем, которые бывают в исследуемом материале (Меньшиков В.В. 1987; Колб В.Г., Камышников В.С. 1982).

В связи с тем, что концентрация калия в плазме невелика, при его определении калибровочный раствор должен содержать также соли натрия.

Натрия в плазме много и он ярко окрашивает пламя, поэтому калибровочный раствор может содержать только соли натрия.

В плазме крови соотношение концентраций этих элементов другое, чем в моче, либо экстрактах из тканей, поэтому калибровочный раствор для крови не подходит для анализа мочи, и наоборот (Меньшиков В.В. 2007).

При приготовлении стандартных растворов для определения натрия в моче (в противоположность исследованию плазмы крови) в их состав вводят калий, так как величина отношения К/Na в моче значительно выше, чем в плазме крови. Разные авторы рекомендуют добавлять калий в пропорции К/Na - 1:1 (Берхин Е.Б.1972; Наточин Ю.В.1972) 1:4 (Меньшиков В.В. 1987, 2007) Мы использовали соотношение 1:2.

Приготовление стандартных и рабочих калибровочных растворов для определения натрия и калия.

Маточный раствор «А» (10 ммоль/л NaCl).

(Mr NaCl = 22,98977+35,453=58,44277 г/моль)

584,427 мг перекристаллизованного NaCl, высушивают до постоянного веса, растворяют в бидистиллированной воде и доводят до объема 1 л.

1 мл такого раствора содержит 10 мкмоль Na.

Маточный раствор «Б» (10 ммоль/л KCl) 745,6 мг перекристаллизованного KCl растворяется в бидистиллированной воде и доводится до объема 1 л.

1 мл такого раствора содержит 10 мкмоль Na.

Рабочие калибровочные растворы для определения натрия в плазме крови: в 100 мл мерные колбы отбирается 1,3, 5,7, 9 мл маточного раствора и доводится до метки бидистиллятом (Таб.9.) Таким образом мы получаем ряд стандартных растворов с концентрацией Na от 0,1 до 0,9 мкмоль/мл.

Таблица №9

Приготовление рабочих растворов для определения натрия в плазме крови	Ед. изм.	Стандартные растворы				
		1,0	3,0	5,0	7,0	9,0
Маточный раствор «А» (10 мкмоль/мл Na)	мл					
Бидистиллированная вода	мл	до 100				
Концентрация натрия в рабочих стандартах	мкмоль/мл	0,1	0,3	0,5	0,7	0,9

согласно инструкции число градуировочных точек может быть от 1 до 5; (диапазон опр. концентраций натрия для ФПА-2 до 1 мкмоль/мл)

Рабочие калибровочные растворы для определения натрия в моче : в 100 мл мерные колбы отбирается 1,3, 5,7, 9 мл маточного раствора «А» и 0,5; 1,5; 2,5; 3,5; 4,5 мл раствора «Б» и доводится до метки бидистиллятом (Таб.10.) Таким образом мы получаем ряд рабочих калибровочных растворов с концентрацией Na от 0,1 до 0,9 мкмоль/мл в соотношении 2:1 с калием.

Таблица № 10

Приготовление рабочих растворов для определения натрия в моче (спонтанн и водный диурез).	Ед. изм.	Стандартные растворы				
		1,0	3,0	5,0	7,0	9,0
Маточный раствор «А» (10 мкмоль/мл Na)	мл	1,0	3,0	5,0	7,0	9,0
Маточный раствор «Б» (10 мкмоль/мл К)	мл	0,5	1,5	2,5	3,5	4,5
Бидистиллированная вода	мл	до 100				
Концентрация натрия в рабочих стандартах	мкмоль/мл	0,1	0,3	0,5	0,7	0,9
Концентрация калия в рабочих стандартах	мкмоль/мл	0,05	0,15	0,25	0,35	0,45

Рабочие калибровочные растворы для определения калия в плазме крови: в 100 мл мерные колбы отбирается 0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5 мл маточного раствора «Б» затем добавляется по 7 мл раствора «А» и доводится до метки бидистиллятом (Таб.11.) Таким образом мы получаем ряд рабочих калибровочных растворов с концентрацией К от 0,01 до 0,05 мкмоль/мл с содержанием натрия 0,7 мкмоль/мл.

Таблица № 11

Приготовление стандартных растворов для определения калия в плазме крови	Ед. изм.	Стандартные растворы				
		0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Маточный раствор «Б» (10 мкмоль/мл К)	мл	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Маточный раствор «А» (10 мкмоль/мл Na)	мл	7	7	7	7	7
Бидистиллированная вода	мл	до 100				
Концентрация калия	мкмоль/мл	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05
	мкмоль/сл сантимилитр	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Концентрация натрия	мкмоль/мл	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7

Для вывода на табло более удобно использовать единицы в мкмолях на сантимилитры, так как 3 цифра после запятой может давать погрешность (по инструкции к прибору предлагается вводить значения концентраций в мг/л)

$$1 \text{ сантмл} = 0,01 \text{ литр} = 10 \text{ мл}$$

$$1 \text{ сл} = 10 \text{ мл}$$

Рабочие калибровочные растворы для определения калия в моче: в 100 мл мерные колбы отбирается 1; 3; 5; 7; 9 мл маточного раствора «Б» добавляется 2; 6; 10; 14; 18 мл раствора «А» и доводится до метки бидистиллятом (Таб.12.) Таким образом мы получаем ряд рабочих калибровочных растворов с концентрацией К от 0,1 до 0,9 мкмоль/мл в соотношении 1:2 с натрием.

Таблица № 12

Приготовление стандартных растворов для определения калия в моче спонтанн и водный диурез	Ед. изм.	Стандартные растворы				
		1,0	3,0	5,0	7,0	9,0
Маточный раствор «Б» (10 мкмоль/мл К)	мл	1,0	3,0	5,0	7,0	9,0
Маточный раствор «А» (10 мкмоль/мл Na)	мл	2	6	10	14	18
Бидистиллированная вода	мл	до 100				
Концентрация калия	мкмоль/мл	0,1	0,3	0,5	0,7	0,9
Концентрация натрия	мкмоль/мл	0,2	0,6	1	1,4	1,8

Ход анализа и расчеты результатов

Концентрация натрия и калия определяется пламенной фотометрией в приготовленных пробах и сравнивается с соответствующими стандартными растворами.

Концентрация натрия, калия в плазме, цельной крови и тканях рассчитывается следующим образом: по данным фотометрии строится калибровочный график в системе координат «показания шкалы гальванометра — концентрация натрия и (или) калия в стандартных растворах». И по соответствующим показаниям шкалы гальванометра определяется концентрация электролитов ($C_{пр}$, ммоль/л) в приготовленных пробах. *(Используемый на кафедре пламенный фотометр ФПА-2 позволяет выводить готовые данные по концентрациям в приготовленных пробах на табло в единицах соответствующих введенным калибровочным точкам)*

Истинная концентрация в плазме и цельной крови ($C_{и}$) рассчитывается по формуле

$$C_{и} = C_{пр} * 200, \text{ ммоль/л,}$$

где 200 — число, учитывающее степень разведения проб.

**Определение кальция в моче и плазме крови
по цветной реакции с крезолфталеинкомплексом
(унифицированный метод).**

Меньшиков В.В., Делегатская Л.Н., Золотницкая Р.П. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник/ Под ред. В.В.Меньшикова. – М.: Медицина. 1987. 368с., на стр.264-265.

Boross M., Szilagyil L Kisrl. Orvostud, 1974, vol. 24, p. 96 -102.

Принцип. Крезолфталеинкомплексон образует с кальцием в щелочной среде комплекс красно-фиолетового цвета, интенсивность окраски пропорциональна концентрации кальция. В реакционную смесь добавляют 8-оксихинолин, который связывает металлы, мешающие определению, но образует с кальцием менее прочный комплекс, чем крезолфталеинкомплексон.

Реактивы.

1. *Боратный буфер:* 200 г борной кислоты (H_3BO_3 , ортоборная кислота) растворяют при нагревании в 300 мл воды, добавляют 580 мл 5 н. КОН, объем доводят водой в мерной колбе до 1 л, при температуре ниже 56 °С из раствора могут выпадать кристаллы.
2. *Глицин 2 моль/л:* 7,5 г глицина растворяют в 40 мл воды, переносят в мерную колбу и доводят объем до 50 мл. Для консервации добавляют 2 капли хлороформа, хранят в холодильнике.
3. *8-Оксихинолин (оксин), 1 % раствор:* 500 мг препарата растворяют в 50 мл абсолютного спирта.
4. *Рабочий буферный раствор:* к 300 мл воды добавляют 12,5 мл боратного буфера и 5 мл раствора глицина, перемешивают и устанавливают величину рН в пределах 10,5— 10,6 с помощью 5 н. КОН, добавляют 50 мл 1 % раствора оксихинолина, переносят в мерную колбу вместимостью 500 мл и доводят до метки водой, после чего снова проверяют рН.
5. *Крезолфталеинкомплексон, 0.1 % раствор:* 10 мг крезолфталеинкомплексона растворяют в 100 мл основного буферного раствора. При хранении в холодильнике реактив стоек не более 2— 3 дней.
6. *Калибровочный раствор:* Основной калибровочный раствор, содержащий кальций в концентрации 25 ммоль/л, готовят, растворяя 250 мг кальция карбоната ($CaCO_3$) в 5 мл 1 н. НСІ. Раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят водой до метки. Для консервации добавляют 2 капли хлороформа.

Одновременно готовят раствор солей магния 3 мг/мл, растворяя 2,5 г хлорида магния (MgCl₂·6H₂O) в 100 мл воды. Из этих растворов готовят рабочие калибровочные растворы, согласно приведенной ниже таблице.

Ход определения. К 3 мл рабочего раствора крезолфталеинкомплексона добавляют 0,05 мл исследуемой сыворотки, перемешивают.

Таблица 13.

Основной калибровочный раствор 25 ммоль/л Са, мл	Раствор магния 3 мг/мл, мл	Вода, мл	Концентрация кальция, ммоль/л
6,0	1,0	До 100	1,5
8,0	1,0	» 100	2,0
10,0	1,0	» 100	2,5
12,0	1,0	» 100	3,0
14,0	1,0	» 100	3,5

Через 5 мин фотометрируют в кювете с длиной оптического пути 0,5 см при длине волны 500— 560 нм (зеленый светофильтр) против рабочего раствора крезолфталеинкомплексона. Одновременно обязательно ставят хотя бы одну калибровочную пробу. Расчет ведут по калибровочной кривой либо по правилу пропорций.

Примечание. Некоторые сорта стекла могут выщелачиваться, отдавая в раствор соли кальция, поэтому лабораторную посуду, особенно пробирки, желательно предварительно вымачивать в соляной кислоте. Определение желательно проводить в сыворотке или в плазме, полученной из гепаринизированной крови, так как щавелевая, лимонная кислота и другие антикоагулянты, связывающие кальций, могут помешать определению.

Нормальные величины для приведенного метода 2,3—2,75 ммоль/л (9 -11мг в 100 мл).

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ОСМОРЕГУЛИРУЮЩЕЙ ФУНКЦИИ ПОЧЕК.

Количественная характеристика.

Для количественной оценки осморегулирующей функции были разработаны формулы, основанные на принципе очищения (Smith, 1956). Образование мочи происходит из ультрафильтрата, имеющего такую же суммарную концентрацию осмотически активных веществ, как и плазма крови. Очевидно, что количество осмотически активных веществ, выделяемых с мочой в 1 час., равно произведению диуреза (V) на осмолярную концентрацию мочи (U_{osm}), а **осмолярное очищение**

$$C_{osm} = \frac{U_{osm}}{P_{osm}} * V \quad (\text{мл/час/100г})$$

При выделении мочи, имеющей такую же концентрацию растворенных веществ, как и плазма крови, $\frac{U_{osm}}{P_{osm}} = 1$, в этом случае $C_{osm} = V$. Во время водного диуреза почки выводят гипотоническую мочу и $\frac{U_{osm}}{P_{osm}}$ становится меньше 1.

Воду выделяемую с мочой, условно делят на две фракции. Принимается, что одна из фракций, численно равная осмолярному очищению, содержит растворенные вещества в той же концентрации, что и плазма крови; другую фракцию считают чистой, свободной от растворенных веществ водой, образовавшейся вследствие активной реабсорбции солей через стенку почечных канальцев. Эту фракцию воды мочи принято обозначать как **очищение плазмы от осмотически свободной воды (C_{H_2O})**. Следовательно,

$$V = C_{osm} + C_{H_2O}; \quad C_{H_2O} = V - C_{osm}$$

В условиях недостатка воды деятельность почки направлена на экономию воды организма и выводится гипертоническая по отношению к плазме моча, максимальная концентрация осмотически активных веществ в которой у человека может в 4-4,5 раза превышать их концентрацию в крови, а у некоторых

пустынных грызунов – в 18-20 раз. **Максимальная реабсорбция осмотически свободной воды** при осмотическом концентрировании (c) обозначается как $T_{H_2O}^c$ и определяется по разности между тем объемом, в котором должны были быть растворены выделяемые почкой осмотически активные вещества, если бы осмотические концентрации мочи и плазмы крови были одинаковы, и действительным объемом выводимой в 1 час мочи:

$$T_{H_2O}^c = C_{osm} - V$$

Рахим образом, величина C_{H_2O} и $T_{H_2O}^c$ характеризуют соответственно объем выделившейся и реабсорбированной осмотически свободной воды.

Другим показателем состояния осморегулирующей функции почки служит **концентрационный показатель** осмотически активных веществ $\frac{U_{osm}}{P_{osm}}$. При гипергидратации он может снижаться у различных животных и человека до 0,1, а при гидropении приобретает максимальное значение, характерное для данного вида животных. У холоднокровных позвоночных $\frac{U_{osm}}{P_{osm}}$ никогда не превышает 1, у птиц и млекопитающих он значительно выше 1 (Smith, 1951; Гинецинский и др., 1961; Рябов С.И., Наточин Ю.В. 1997).

Определение мочевины в слоях тканей почки по фенолгипохлоритной реакции

Гасанов С.Г. Количественное определение мочевины в тканях по фенолгипохлоритной реакции // Лабор. Дело. - 1962. - №12. - С.3-6.

(в нашей модификации (рац. предложение №241, от 20.12.2006; рац. предложение 242, от 20.12.2006).

Определение мочевины.

Для определения мочевины этим методом необходимы простые реактивы: 1) этиловый или метиловый спирт; 2) 0,1 н. соляная кислота; 3) 2 % раствор гипохлорита натрия; 4) 5% раствор фенола. Получение специфической зеленой окраски на мочевины во многом зависит от правильного приготовления гипохлорита натрия. В настоящей работе приводится наиболее удобный и простой способ его приготовления.

Приготовление гипохлорита натрия.

В химический стакан на 500 мл помещают 100 г хлорной извести и 170 мл дистиллированной воды, в которую заранее добавлено 70 г пищевой соды. Все тщательно перемешивают в течение 15 минут. После смешивания масса сначала густеет, затем опять разжижается. Образующийся углекислый кальций выпадает в осадок, а в растворе остается гипохлорит натрия и хлористый натрий. Через 2-3 часа жидкость отделяют от осадка путем центрифугирования (в больших стеклянных стаканах). При отсутствии центрифуги смесь оставляют до следующего дня и осторожно сливают жидкость с осадка. Полученный раствор слабо активен, и для приготовления нужного раствора его надо постепенно добавить ко второй порции такой же смеси 100г хлорной извести со 170 мл дистиллированной воды. Смесь тщательно перемешивают и оставляют на сутки. На следующий день бесцветный или слегка фиолетовый раствор гипохлорита натрия сливают с осадка и фильтруют через беззольный фильтр в темную склянку с притертой пробкой. Получается около 150-200 мл раствора гипохлорита натрия.

Концентрацию устанавливают по содержанию активного хлора. Для этого испытуемый раствор в количестве 1 мл разбавляют в мерной колбе дистиллированной до 50 мл, отбирают 25 мл (0,5 мл первоначального раствора), добавляют 50 мл 0,1 н. раствором гипосульфита до обесцвечивания. Содержание активного хлора в растворе гипохлорита натрия рассчитывают по формуле:

$$V \times 0.0035 \times 2 \times 100 = \% \text{ активного хлора,}$$

где V – объем гипосульфита, пошедшего на титрование.

Рабочий раствор гипохлорита натрия готовят путем разбавления полученного раствора дистиллированной водой до 2 % концентрации. Раствор гипохлорита натрия сохраняет свою активность в течении нескольких месяцев при хранении его в темном прохладном месте. Время от времени необходимо проверять его активность. До начала работы следует приготовить калибровочную кривую (см. рисунок). Стандартом служит спиртовой раствор мочевины, где в 1 мл содержится 0,05 мг мочевины.

В качестве гипохлорита натрия можно применять «Белизну» ТУ 2382-255-00209645-2002 средство отбеливающее и дезинфицирующее на основе гипохлорита натрия отечественного производства, который можно найти в любом магазине хозяйственных товаров (рац. предложение 242, от 20.12.2006). Перед работой следует уточнить концентрацию гипохлорита натрия согласно методике (массовая доля гипохлорита натрия в р-ре Белизны (в персчете на активный хлор) по инструкции составляет 7%).

Количественное определение мочевины в ткани.

На торсионных весах взвешивают 100 мг ткани и растирают в ступке с 10 мл 96° этилового спирта; при этом белки осаждаются, а мочевины извлекают спиртом. Осаждение белка можно проводить и метиловым спиртом, но при этом калибровочная кривая тоже должна быть приготовлена с метиловым спиртом. Полученную взвесь фильтруют через беззольный фильтр после тщательного растирания в течение 8-10 минут. На определение берут 1 мл спиртового фильтрата, что соответствует 10 мг ткани.

Для упрощения пробоподготовки тканей мы использовали пестиковый ручной гомогенизатор Поттера – Эвельгейма со стеклянным пестом, который позволяет произвести более полную гомогенизацию (вплоть до разрушения клеточной структуры), чем при работе со ступкой, в более короткий срок, без особых усилий. Гомогенизация данным способом предотвращает потери раствора с испаряющимся спиртом, что позволяет снизить ошибки исследования (рац. предложение №241, от 20.12.2006).



К 1 мл фильтрата добавляют 3 мл 96° этилового спирта, 2-3 капли 0,1 н. соляной кислоты, 0,5 мл 2% раствора гипохлорита натрия, 0,5 мл 5 % раствора фенола. Реактивы вносят строго в указанной последовательности при постоянном перемешивании. Сразу после добавления последнего реактива (фенола) появляется желтое окрашивание, которое через 2-3 минуты постепенно переходит в зеленое. Через 40-60 минут, когда интенсивность окраски достигает максимальных величин, определяют оптическую плотность раствора против воды.

Количественное содержание мочевины в пробе находят по калибровочной кривой и рассчитывают на 100 г ткани, умножая на 10 000 (если был взят 1 мл спиртового фильтрата, соответствующий 10 мг ткани).

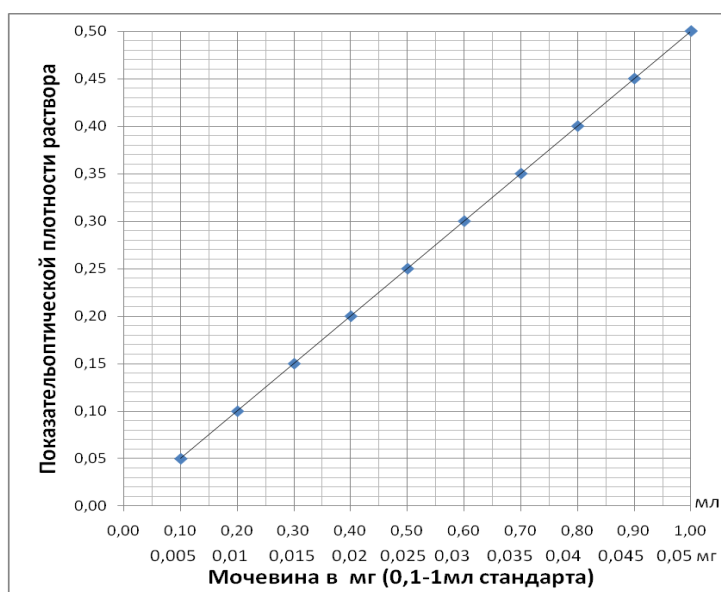


Рис.15.

Этим же методом можно определять количественное содержание мочевины в ткани, высушенной в термостате при 37 °, а затем в эксикаторе над серной кислотой до постоянного веса и растертой в порошок. Определение в сухой ткани имеет то преимущество, что концентрация мочевины относится к сухому веществу.

Естественно, что содержание мочевины в сухой ткани в несколько раз превышает ее содержание в нативной. Содержание мочевины в последней составляет в среднем 75-100 мг%, а сухой ткани - 300-350 мг% с небольшими колебаниями в параллельных пробах.

Для уменьшения ошибки опыта следует придерживаться одного и того же времени и проводить определения в фотоэлектроколориметре через 40-60 минут после добавления фенола. В этот период получается наибольшая оптическая плотность раствора за счет специфической зеленой окраски на мочевины. Спустя 2-3 часа и в последующее время окраска постепенно изменяется вследствие разложения мочевины и выделения аммиака, придающего зеленому раствору голубой оттенок.

Определение натрия и калия в слоях тканей почки.

Основой данного метода является прямое пламенно-фотометрическое определение натрия и калия в предварительно разбавленных кислотных экстрактах из сухих обезжиренных тканей (Руммель А.Г., Баженова А.Ф. 1967)

Оборудование и реактивы

- Пламенный фотометр для определения натрия и калия ФПА-2
- Центрифуга
- Электромагнитная мешалка любого типа.
- Сушильный шкаф с регулируемой температурой 100 - 105° С.

Посуда

- Мерные колбы емкостью 25, 50, 100 и 1000 мл.
- Проволочные зажимы из нержавеющей стали.
- Стеклянные стаканы емкостью 50 мл.
- Флаконы емкостью 10—15 мл (флаконы из-под пенициллина) .
- Пипетки градуированные на 0,1; 0,2; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 мл.
- Центрифужные пробирки емкостью 12 и 30 мл.
- Фарфоровая ступка с пестиком (либо гомогенизатор Поттера Эвельгейма).

Реактивы

- Азотная кислота особой чистоты
- NaCl перекристаллизованный х. ч
- KCl перекристаллизованный х. ч
- NaOH х. ч
- H₂SO₄

Приготовление стандартных и рабочих растворов для определения натрия и калия в тканях.

1. 0,75н и 0,83н раствор азотной кислоты (табл. 14).
2. Рабочие стандартные растворы для совместного определения натрия и калия в тканях (табл. 15).
3. 0,75н раствор NaOH готовится в день проведения анализа.

Таблица 14

Реактив	Концентрация HNO ₃	Литры				
		1	2	3	4	5
Количество миллилитров концентрированной HNO ₃ (уд. весом 1,418 г/см ³ при t=20° С	0,75н	47	94	141	188	235
	0,83н	52	104	156	208	260

Таблица 15

Приготовление стандартных растворов	Ед. изм.	Стандартные растворы									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Маточный раствор «А»	мл	0,5	1,0	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0	14,0	16,0
Маточный раствор «Б»	мл	0,5	1,0	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0	14,0	16,0
0,83н раствор HNO ₃	мл	До 100 мл									
Концентрация натрия и калия	мэкв/л	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6

Подготовка образцов тканей почки к анализу.

Кусочки свежей ткани взвешиваются на аналитических весах в количестве 500—600 мг с точностью $\pm 0,0001$ г и высушиваются до постоянного веса при температуре 105°С (48—72 ч). Затем ткань обезжиривается в нормальном гексане (15—20 мл н-гексана на 100—160 мг сухой ткани) в течение 8—10 ч. Обезжиренная ткань снова взвешивается и растирается в фарфоровой ступке. 45—55 мг полученного порошка помещается в мерную колбу емкостью 25 мл и заливается до метки 0,75 н раствором азотной кислоты. Кислотная экстракция проводится 3 суток при периодическом встряхивании. (При постоянном встряхивании в аппарате кислотная, экстракция заканчивается через 18—24 ч.) По окончании экстракции содержимое колб переливается в центрифужные пробирки емкостью 30 мл и центрифугируется при 500—700 об/мин 10 мин. Надосадочная жидкость отделяется.

Ход анализа и расчеты результатов анализа

Концентрация натрия и калия определяется пламенной фотометрией в приготовленных пробах и сравнивается с соответствующими стандартными растворами.

Для определения концентрации натрия и калия в тканях по данным фотометрии строится калибровочный график в системе координат «показания шкалы гальванометра — концентрация натрия и (или) калия в стандартных растворах».

по соответствующим показаниям шкалы гальванометра определяется концентрация электролитов ($C_{пр}$, мэкв/л) в приготовленных пробах. (Используемый на кафедре пламенный фотометр ФПА-2 позволяет выводить готовые данные по концентрациям в приготовленных пробах на табло без расчета)

Содержание натрия и калия в тканях ($C_{тк}$) рассчитывается по формуле

$$C_{тк} = \frac{C_{пр} * 25 * 1000}{P}, \text{ мэкв/кг}$$

где P — навеска порошка сухой обезжиренной ткани, мг;

25 — число, учитывающее степень разведения;

1000 — переводной коэффициент.

Приложение

Лабораторные показатели крыс

Биологические характеристики:

Продолжительность жизни	2-3 года
Половая зрелость в возрасте	60-70 дней
Физиологическая зрелость	80-90 дней
Продолжительность беременности	16-23 (18) дня
Плодовитость	5 - 9 крысят в помете (8 – 14)
Продолжительность лактации	28-35 дней
Масса новорожденных крысят	3-6 г
Возраст прозревания крысят	14-17 дней
Возраст отсадки молодняка	21-35 дней
Масса тела взрослого животного	200 – 400 г

Зоотехнические параметры:

Число крыс на одну клетку	6 - не более 10 голов
Расстояние между прутьями клетки	не более 15 мм
Фронт кормления	2 см/гол
Фронт поения	1 см или 2 нипп. поилки на 10 голов
Температура воздуха	20-22 град. С
Относительная влажность воздуха	50-60%
Нормы освещения	50 лк

Основные физиологические данные крыс:

Частота дыхания	85 – 110/мин
Артериальное давление (сист/диаст)	120/80 мм рт.ст.
Количество крови	76-90 мл/кг живой массы
Пульс	300-500 уд./мин.
Ректальная температура	38,5-39,5 град. С
Количество выделяемого кала	до 30 г/гол./сутки
Количество выделяемой мочи	2,4- мл/гол./сутки

Лейкоцитарная формула крови белых крыс

Лимфоциты, %	65-77
Моноциты, %	0,1-4
Нейтрофилы, %	13-30
Эозинофилы, %	1-5
Гематокрит, %	40-50
Базофилы, %	0 - 1

Морфологический состав крови:

Эритроцитов	5,5–11,0 (-8)•10 ¹² /л). Их диаметр 5,7-7 мкм, продолжительность жизни 8 дней.
Лейкоцитов	8,0-23,6 • 10 ⁹ /л (в среднем 12,5 • 10 ⁹ /л)
Количество ретикулоцитов	0,6-4,9 % общего числа эритроцитов.
Количество тромбоцитов	300 - 500 • 10 ⁹ / л (в среднем 400 • 10 ⁹).
Гемоглобин в венозной крови	7,94 - 11,91 ммоль/л (128 - 192 г/л), в среднем 9,93 ммоль/л (160 г/л).

Биохимический состав крови

Азот остаточный сыворотки	22,1-27,1 ммоль/л (у крысят: 49,3 ммоль/л)
Белок общий сыворотки	69,0-76,0 г/л (у крысят - 48,0 г/л).

Альбумин сывороточный	26,0-35,0 г/л.
Глобулин сывороточный	33,0-50,0 г/л
А/Г коэффициент	(1,0-) 0,8- 1,3
Фибриноген плазмы	1,6-3,4 г/л
Билирубин общий крови	5,4-10,8 (-8,16) мкмоль/л
(рН) плазмы артериальной крови	7,35 (7,26-7,44)
Вязкость сыворотки	1,44-1,96
Глюкоза сыворотки	5,05-7,88 ммоль/л
Калий сыворотки	5,11-5,27 ммоль/л
Кальций сыворотки	2,35-2,67 ммоль/л
Кетоновые тела цельной крови	288-1345 мкмоль/л
Осмолярность крови	397 мосм/кг
Креатинин крови	0,055-0,075 ммоль/л (55-75 мкмоль/л)
Магний сыворотки	0,65— 1,05 ммоль/л
Медь сыворотки	9,4-18,9 мкмоль/л
Молочная кислота плазмы	4,9 ммоль/л
Мочевая кислота сыворотки	107-178 мкмоль/л
Мочевина сыворотки	7,5 - 14 ммоль/л
Натрий сыворотки	140-157 ммоль/л
Относительная плотность крови	1,054
АлАТ, Е/л	110,0-140,0
АсАТ, Е/л	72,0-196,0
Липаза панкреатическая, Е/л	16,0-24,0
Общая α -амилаза, Е/л	489,0-609,0
Фосфатаза щелочная сыворотки, Е/л	1066,0-1220,0
Фосфор общий крови	12,3-14,2 ммоль/л
Хлориды (плазмы // эритроцитов)	103-114 ммоль/л // 56-71 ммоль/л
Холестерин общий сыворотки	1,3-2,1 ммоль/л
Нормы показателей мочи	
Диурез	0,055 – 0,097 мл/час/100 г
Цвет	светло-желтый
Прозрачность	прозрачная
Слизь	отсутствует/следы
Эпителий	следы
Белок мочи	отс. или следы до 0,08 – 0,1 мг/мл
Гиппуровая кислота	8,57-10,18 мг/мл(Кигель Т.Б. и др., 1978)
Глюкоза	отсутствует
Креатинин	9,5–17 (-13) мкмоль/мл (ммоль/л) СКФ 14–19 (-16) мл/час/100г)
Кровь/Гемоглобин	отсутствует
Эритроциты	отсутствуют
Лейкоциты	отсутствуют/следы
Мочевина	(500-) 400–700 мкмоль/мл (ммоль/л)
Удельный вес(относительная плотность)	1,010-1,020
Осмолярность мочи	1660 мосм/кг
рН	5,7-9,4 (-7,75)

ЛИТЕРАТУРА

1. Берхин Е.Б., Иванов Ю.А. Методы экспериментального исследования почек и водно-солевого обмена / Барнаул, 1972. - 199с.
2. Бландова З.К., Малашенко А.М. и др. Правила разведения инбредных лабораторных животных / Методические указания, М.: Москва, 1979г.
3. Гасанов С.Г. Количественное определение мочевины в тканях по фенолгипохлоритной реакции // Лабор. Дело. - 1962. - №12. - С.3-6.
4. Данилова Л.А. Справочник по лабораторным методам исследования / Под ред. Л.А. Даниловой. СПб.: Питер, 2003. 736 с.
5. Камышников В.С. Клинико-биохимическая лабораторная диагностика / Справочник. Мн.: Интерпрессервис, 2003. Т. 2. 463 с.
6. Каркищенко Н.Н. Основы биомоделирования. - М.: Изд-во ВПК, 2004. - 608 с.
7. Ким Ю.В., Шибанов А.Н. Пирогаллоловый метод определения белка в моче (обзор литературы) // Клини. лаб. диагн. 2004. № 10. С. 3-7.
8. Меньшиков В.В. Клинико-лабораторные аналитические технологии и оборудование / под ред. В.В. Меньшикова М.: Академия, 2007. С45-50
9. Козлов А. В. Протеинурия. Методы ее выявления / А. В. Козлов. - Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2008. - 60 с.
10. Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии. Минск.: «Белорусь», 1982, 359 с.
11. Кохила Т. Т. Гигиена и содержание SPF-отделений вивария //Материалы симпозиума «Современные методы в выращивании и содержании лабораторных животных », Москва. 1988г. С.36.
12. Меньшиков В.В., Делегатская Л.Н., Золотницкая Р.П. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник/ Под ред. В.В.Меньшикова. – М.: Медицина. 1987. 368с.
13. Методические рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием животных // Ланималогия. - 1993. - №1. - С.29.
14. Методические указания по применению унифицированных клинических лабораторных методов исследования / Под ред. В. В. Меньшикова. М., 1973, 174 с.
15. Пупкова В.И., Прасолова Л.М. Метод с пирогаллоловым красным - альтернатива традиционным методам определения белка в моче //Клиническая лабораторная диагностика, 2010.-N 6.-С.17-21.
16. Рахманов А.И. Декоративные мыши и крысы. М.: Аквариум, 2000, 144с.
17. Регламентация экспериментов на животных - этика, законодательства, альтернативы. / Под ред. Н. А. Горбуновой. - М.. 1998.
18. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных // www.nar.edu/books/0309083893/html/R1.html
19. РуммельА.Г., Баженова А.Ф. Методика определения натрия, калия и хлора в биологических жидкостях и тканях // Кортикостероидная регуляция водно-солевого гомеостаза. – Новосибирск, 1967.-С.234-243.

20. Рябов С.И., Наточин Ю. В. Функциональная нефрология. / СПб: Лань, 1997,- 304 с.
21. Северин С.Е. Практикум по биохимии / Под ред. С.Е. Северина, Г.А. Соловьевой, М.: Изд-во МГУ, 1989. 509с., на стр..81.
22. Трахтенберг И.М., Сова Р.Е., Шефтель В.О., Оникиенко Ф.А. Показатели нормы у лабораторных животных в токсикологическом эксперименте. - М.: Медицина, 1978.
23. Требования Международного комитета по науке по использованию в экспериментальных исследованиях лабораторных животных // Бюллетень ИКЛАС. - 1978. - № 24. - С. 4-5.
24. Физиологические показатели нормы животных. М.: Аквариум , 2001, 256с.
25. Штефель В.О. О сроках воздействия при моделировании интоксикаций в токсиколого-гигиенических исследования // Гигиена и санитария – 1996. №8. С.70-72.
26. Dilena B. A. Six methods for determination protein compared / B. A. Dilena, L. A. Penberty, C. G. Fraser // Clin. Chem. - 1983. - Vol. 29, № 3. - P. 553-557.
27. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Research Council, National Academy Press, Washington, D.C.1996.
28. Popper H., Mcmdel Mayer H.- Biochem. Z., 1937, vol., 291, p. 354.
29. The Laboratory Rat, 2nd Edition. Ed. by Mark A. Suckow, Steven H. Weisbroth and Craig L. Franklin, Academic Press, 2006. 926 p.

