

Лабораторна робота №1
Кількісне визначення молочної кислоти
Теоретичний вступ

Молочна кислота є продуктом анаеробного гліколізу і накопичується у м'язах за умов нестачі кисню. Причиною такої ситуації може бути високоінтенсивна фізична робота, знижений парціальний тиск кисню в повітрі (середньо- і високогір'я), зменшення просвіту судин (засмічення холестериновими бляшками). Уміст молочної кислоти в м'язах становить 0,01-0,02%. Він різко зростає при гіпоксії. Якщо молочна кислота накопичується в м'язах унаслідок фізичних навантажень, то її часткова утилізація відбувається у серцевому м'язі, де накопичування кисню в 15 разів вище, ніж у інших тканинах, а 40% сухого залишку міокарду складають мітохондрії. Отже, в умовах фізичного навантаження в енергетичному обміні серцевого м'яза збільшується частка споживання не тільки глюкози, але й молочної кислоти.

Зменшене постачання міокарда кров'ю (ішемія) зумовлює появу гіпоксії. Гіпоксія ж зменшує частку аеробного окисного фосфорилування і сприяє накопиченню молочної кислоти у міокарді, що веде до ацидозу, який своєю чергою гальмує процес анаеробного ресинтезу АТФ знижує скоротливість міокарда. Молочна кислота призводить до набряку клітин, зростає інтенсивність перекисного окиснення ліпідів мембран, внутріклітинні ферменти виходять у кров, а внаслідок тривалої ішемії міокард ушкоджується (інфаркт).

За змінами вмісту молочної кислоти у тканинах, крові та сечі визначають анаеробну частку енергетичного обміну, що є важливим критерієм у діагностиці захворювань, пов'язаних з гіпоксією (ішемія, інфаркт міокарда, міопатії).

Принцип методу. В основі методу є кольорова реакція Штрёма, яка полягає в тому, що молочна кислота, розчинена у концентрованій сірчаній кислоті (на пробу Савалія!) при наявності іонів Si^{2+} з параоксидифенілом утворює продукт фіалкового кольору, оптична густина якого відповідає її концентрації.

Реактиви:

1. концентрована сірчана кислота за Савалем. Від якої залежить можливість виконання аналізу.
2. суміш з 3 г мідного купоросу (CuSO_4) і 9 мл ортофосфорної кислоти. Повинен утворитися гомогенний розчин, на це потрібен певний час.
3. 1,5% розчин параоксидифенілу в диметилформаміді розчиняють 15 мг параоксидифенілу в 1 мл диметилформаміду.
4. 5% трихлороцтова кислота (ТХОК).

Прилади і матеріали: ФЕК, центрифуга, піпетки, пробірки, дозатори піпеткові, скарифікатори, ємність для забору сечі, антисептик, вата.

Хід роботи

0,02 мл крові виливають в 1 мл 5% ТХОК, через декілька хвилин центрифугують при 2000-3000 об/хв впродовж 5 хв. До 0,2 мл безбілкового фільтрату додають 0,1 мл реактиву 2 і 2,5 мл концентрованої сірчаної кислоти (реактив 1).

Енергійно збовтують і точно через 3 хвилини ставлять на 3 хвилини у киплячу водяну баню, 3 хвилини охолоджують у льодяній воді. Додають 1 краплю розчину реактиву 3, ця крапля повинна потрапити в центр пробірки; змішують і залишають стояти 10 хвилин при кімнатній температурі. Потім нагрівають на киплячій водяній бані 1,5 хвилини, охолоджують і фотометрують при довжині хвилі 565 нм.

Одночасно ставлять холосту пробу, в якій замість безбілкового фільтрату беруть 5% розчин ТХОК, і калібрувальні дослідні, в яких беруть розчин ТХОК, який містить в 0,2 мл від 2-20 нмоль молочної кислоти або молочнокислого літію; їх обробляють так само як дослідні. Колір калібрувальної проби, яка містить 2 нмоль молочної кислоти, відповідає пробі з умістом 0,5 ммоль / л, відповідно колір проби, яка містить 20 нмоль відповідає концентрації 5 ммоль / л. Норма вмісту молочної кислоти в крові менше ніж 1 ммоль / л.

Визначення молочної кислоти в сечі

1 мл сечі розчиняють в 50 мл води, звідки набирають 0,5 мл для досліді, додаючи 0,02 мл Cu SO_4 (4%) і 3 мл $\text{H}_2 \text{SO}_4$. Добре перемішують і ставлять у

киплячу водяну баню на 5 хв. Охолоджують до кімнатної температури і додають 0,05 мл 1,5% розчину пара-оксидифенілу, добре струшують і ставлять до розвитку забарвлення у водяну баню при температурі 20°C на 30 хв. Потім сталять на 90 с в киплячу водяну баню. Швидко охолоджують до кімнатної температури і фотометрують на ФЕКу при 580 нм (червоний світлофільтр) за величиною екстинції (оптичної густини), використовуючи криву, визначають концентрацію молочної кислоти.

Клініко-діагностичне значення

Лактатний ацидоз (стійкий збільшений уміст молочної кислоти) виникає внаслідок такого:

– внаслідок тканинної гіпоксії (за рахунок гіперперфузії нирок, порушення циклу Корі в печінці, зниження артеріального P_{O_2});

– через вплив лікарських препаратів та інших хімічних сполук (етанол, метанол, фенформін, фруктози, сорбітолу);

– як результат вроджених вад обміну речовин (дефекти глюконеогенезу або окиснення пірувату).

Контрольні питання

1. До якої групи речовин належить молочна кислота?
2. Продуктом якого обміну є молочна кислота?
3. Де нагромаджується молочна кислота? Які зміни відбуваються при цьому?
4. Чи змінюється рівень молочної кислоти при тренуванні?

Ситуаційні завдання

1. У артеріальній крові виявили надлишковий вміст молочної кислоти (понад 90 нмоль/л). Яке значення рН буде спостерігатися?

2. У артеріальній крові спостерігали знижений уміст рН=7,05. Яке рН в нормі? Які причини такої ситуації?

3. Парціальний тиск вуглекислого газу (CO_2) знижений. Що слід чекати стосовно рН крові? Як називається таке явище?

4. Метаболічний та респіраторний ацидоз супроводжується накопиченням іонів H^+ . В обох випадках спостерігається накопичення молочної кислоти. За яким показником їх можна розрізнити?

5. Що таке лактатний ацидоз, які його причини?

6. Встановити клініко-діагностичне значення біохімічного маркера-лактат крові та лактат сечі.

Лабораторна робота №2

Кількісне визначення піровиноградної кислоти в сечі колориметричним методом

Теоретичний вступ

Піровиноградна кислота є продуктом обміну вуглеводів. За аеробних умов відбувається її окисне декарбоксилювання за участю ферментного комплексу ліпотіамін-пірофосфату і з утворенням ацетил-КоА, який далі розщеплюється у циклі Кребса. Нестача будь-якої складової ферментного комплексу, а також нестача кисню ведуть до сповільнення процесу утворення ацетил-КоА. Окиснення ацетил-КоА в циклі Кребса та в мітохондріальному дихальному ланцюгу до CO_2 і H_2O також зменшується. Обмін вуглеводів, що протікає в гіпоксійних умовах, гальмується на рівні молочної кислоти. Наступне її окиснення до піровиноградної кислоти стане можливим за умов появи достатньої кількості кисню. Крім обміну вуглеводів, ПВК бере участь в обмінах жирів (на рівні перетворення гліцерину) та білків (реакції деамінування і переамінування амінокислот).

Надмір утворення ПВК в тканинах супроводжується їх посиленою елімінацією в кров. При фільтрації крові у нирках ПВК, як низькомолекулярна сполука, частково не абсорбується і попадає в сечу. У здорових людей за добу з сечею екскретується 10-25мг ПВК.

Принцип методу. Піровиноградна кислота, взаємодіючи з 2,4-динітрофенілгідразином у лужному середовищі, утворює 2,4-динітрофенілгідразон піровиноградної кислоти коричнево-червоного забарвлення, інтенсивність якого пропорційна до концентрації піровиноградної кислоти і визначається фотометрично.

Реактиви: стандартний розчин (20 мл в 1 л H_2O), 0,1% розчин 2,4-динітрофенілгідразину в 2н розчині соляної кислоти, 12% розчин їдкового натрію.

Прилади: фотоелектроколориметр.

Хід роботи

Беруть дві пробірки, в одну наливають 0,1 мл стандартного розчину піровиноградної кислоти, а потім в обидві додають по 0,9 мл води і по 0,5 мл

0,1% розчину 2,4-динітрофенілгідразину, змішують і на 20 хв залишають у темному місці. Пізніше додають по 1 мл 12% розчину їдкого натрію і через 10 хв визначають на ФЕКу оптичну густина забарвлених розчинів проти води при синьому світлофільтрі.

Розрахунок

Концентрацію піровиноградної кислоти розраховують за формулою:

$$C_{\text{д}} = C_{\text{СТ}} \times E_{\text{д}} \times 1,5 / E_{\text{СТ}}$$

де:

$C_{\text{д}}$ – концентрація піровиноградної кислоти в сечі (мг/добу);

$C_{\text{СТ}}$ – концентрація стандартного розчину піровиноградної кислоти (20мг/1л);

$E_{\text{д}}$ – оптична густина досліджуваної проби;

$E_{\text{СТ}}$ – оптична густина стандарту піровиноградної кислоти;

1,5 – перерахунок на добову кількість сечі.

Клініко-діагностичне значення

У здорових людей зі сечею за добу виділяється 10 – 25 мг піровиноградної кислоти. Екскреція збільшується при B_1 -вітамінній недостатності, захворюваннях печінки, цукровому діабеті, серцевій декомпенсації, токсикозах, гіпоксіях різного походження.

Контрольні питання

1. Продуктом якого обміну є ПВК?
2. Яка ферментна система бере участь у окисному декарбоксилюванні ПВК?
3. За яких умов екскреція ПВК збільшуються?
4. В обміні яких речовин бере участь ПВК?
5. Який показник екскреції ПВК є нормою?
6. У що перетворюється ПВК внаслідок окисного декарбоксилювання?
7. Який принцип методу виявлення ПВК у сечі?
8. За якою формулою розраховують концентрацію ПВК?
9. Яке клініко-діагностичне значення ПВК?

10. При якій довжині хвилі колориметрують продукт, інтенсивність якого пропорційна до концентрації ПВК?

Ситуаційні завдання

1. Вміст ПВК у сечі становить 45 мг/добу, які причини і наслідки такого стану?

2. Виявили гіперекскрецію пірувату. Який вітамінний комплекс можна порекомендувати для усунення цього явища?

Лабораторна робота №3

Визначення активності лактатдегідрогенази в сироватці крові

Теоретичний вступ

Визначення активності ферментів (лактатдегідрогенази, креатинкінази, амінотрансферази, гістидази, лужної фосфатази) у сироватці крові має важливе діагностичне значення. Відомо близько 50 ферментів крові. У нормі активність їх невелика, але при окремих патологіях різко збільшується (гіперферментемія) або знижується (гіпоферментемія). Хвороби, що супроводжуються порушенням проникності клітинних мембран окремих органів, часто призводить до раптового підвищення активності того чи іншого ферменту в крові. При ураженні печінки змінюється активність аланінової амінотрансферази, при ураженні серцевого м'яза – аспарагінової амінотрансферази, лактатдегідрогенази і креатинкінази; при рахіті – лужної фосфатази. Активність ферментів крові в різні періоди дитинства змінюються неоднаково. З віком знижується активність багатьох ферментів гліколізу та циклу Кребса, а підвищується активність ферментів амінокислотного обміну та процесу утворення сечі.

Лактатдегідрогеназа – гідролітичний фермент, який каталізує окиснення L-лактату до піровиноградної кислоти. Для лактатдегідрогенази (ЛДГ) необхідний кофермент нікотинамідаденіндинуклеотид (НАД⁺) як проміжний акцептор водню. Реакція, що каналізується ДЛГ, може бути зображена таким чином:



ЛДГ є практично в усіх тканинних структурах. Найбільша активність ЛДГ виявлена у нирках, серцевому м'язі, скелетній мускулатурі, печінці, підшлунковій залозі, головному мозку. ДЛГ є не тільки в сироватці, але й у значній кількості в еритроцитах. Тому сироватка крові, яка береться для аналізу, не повинна бути гемолізована.

У здорових людей активність лактатдегідрогенази в середньому дорівнює 180 одиниць з коливаннями від 80 до 250. Її активність можна виразити також

у мілімолях НАДН + Н⁺, який утворився за одну хвилину в 100 мл сироватки. Лактатдегідрогеназа гетерогенна. За допомогою елетрофорезу виділяють 5 ізоферментів, які позначаються як ЛДГ₁ – ЛДГ₅ і відрізняються фізико-хімічними параметрами. ЛДГ₁ – фракція, що в електронному полі, термостабільна, піруватзалежна, сечовиностабільна, споріднена з піруватом, а також із α -оксибутиратом.

Водночас оксибутиратдегідрогеназа (ОБД), що окиснює оксибутират до ацетоацетату, має виражену органоспецифічність (подібно до ЛДГ₁) щодо серцевого м'яза. Враховуючи цей факт, активність ОБД певною мірою відображає і вміст ЛДГ₁ у крові. Обидва ці ферменти свідчать про ступінь ураження серцевого м'яза і служать раннім і специфічним тестом біохімічної діагностики інфаркту міокарда.

Методика визначення активності ОБД аналогічна до описаної для ЛДГ з тією різницею, що як субстрат використовується оксибутират. Зважаючи на те, що не для всіх біохімічних лабораторій визначення ізофракцій ЛДГ є доступним, нерідко використовують простішу і не менш інформативну методику – визначення активності ОБД.

Принцип методу. L – лактат у лужному середовищі (рН 10) при наявності лактатдегідрогенази і додаванні НАД⁺ окиснюється до пірувату. Мірою активності ферменту є швидкість росту оптичної густини при 340 нм, оскільки спектри поглинання відновлених і окиснених форм НАД⁺ різні. За одиницю лактатдегідрогеназної активності приймають збільшення екстинції (ΔE) на 0,001 в умовних одиницях.

Реактиви: інкубаційна суміш: 0,1 мл сироватки, 0,1 мл НАД⁺ 0,02М, 2 мл гліцеринового буфера 0,1М (рН 10,0), 0,5 мл 0,5М ДЛ - лактату і 1 мл дистильованої води.

Прилади і матеріали: спектрофотометр, пробірки, водяна баня, піпетки.

Хід роботи

У пробірку наливають інкубаційну суміш і інкубують 30 хв при температурі 37° С. Реакцію припиняють, занурюючи в киплячу водяну баню на 3 хв. Паралельно ставлять контроль під проби, де замість сироватки крові

беруть 0,1 мл води. Спектрометрують при 340 нм, порівнюючи з контрольною пробою. При цьому відзначають початок реакції при допомозі секундоміра і вимірюють екстинцію E кожні 30 с, з того моменту, коли реакція почалася, впродовж 3 хв, і слідкують за підвищенням оптичної густини внаслідок утворення НАДН⁺ Н⁺. Розрахунок активності ферменту проводять за такою схемою:

$$E = \Delta E * 1000 / T,$$

де: E – активність ферменту, яка вимірюється в умовних одиницях екстинції;

ΔE – сума величини екстинції впродовж 3 хв, виміряних з інтервалом 30 с, порівняно з контрольною пробою:

T – час інкубації;

1000 – коефіцієнт для перерахунку на 100 мл сироватки крові.

Клініко-діагностичне значення

Активність лактатдегідрогенази підвищується при ураженні міокарда, лейкозах, гострому вірусному гепатиті, ниркових захворюваннях, серпоподібній клітинній анемії, тромбоцитопеніях, інфекційних мононуклеозах, а також прогресивній м'язовій дистрофії. Усі захворювання, які перебігають з некрозом тканин (інфаркт міокарда, деякі ураження нирок, гепатити, панкреатити, пухлини), як правило супроводжуються різким підвищенням активності лактатдегідрогенази в сироватці крові.

Слід зазначити, що будь-яка тканинна деструкція супроводжується збільшенням активності ЛДГ, при цьому ступінь гіперферментемії залежить від глибини і поширеності процесу. Ізоферментні тести є інформативнішими, оскільки їх органна специфічність яскравіше виражена. Збільшення вмісту ЛДГ₁ має важливе значення в діагностиці інфаркту міокарда, ЛДГ₂ і ЛДГ₃ – гострого лейкозу. ЛДГ₄ і ЛДГ₅ – паренхіматозного ураження печінки. ЛДГ₃ – ізофермент, активність якого збільшується при багатьох злоякісних захворюваннях. Чітка і закономірна зміна ЛДГ₁ при інфаркті міокарда, ЛДГ₅ – при гепатитах забезпечує високу органну специфічність цих ізоформ.

Контрольні питання

1. Яка роль лактатдегідрогенази в обміні речовин?
2. Ізоформи ЛДГ і їх діагностичне значення.
3. Яка активність ЛДГ у здорових людей ?
4. Чому оксибутиратдегідрогеназа відображає вміст ЛДГ₁ у крові ?
5. Формула розрахунку активності ЛДГ-фермента.
6. Який кофермент бере участь у реакції, що каталізує ЛДГ?
7. Який принцип методу визначення активності ЛДГ?

Ситуаційні завдання

1. У пацієнта підвищена активність ЛДГ. Ознакою яких захворювань це може бути?
2. У пацієнта діагностовано гострий вірусний гепатит. Яка активність ЛДГ спостерігатиметься і яку її ізоформу треба визначати?
3. Гострий лейкоз супроводжується підвищенням активності якої ізоформи ЛДГ?
4. Активність якого ізоферменту збільшується при злоякісних пухлинах?
5. За якою формою ЛДГ діагностують інфаркт міокарда?

Лабораторна робота №4

Визначення неорганічного фосфору в сечі

Теоретичний вступ

Біологічна роль фосфору в організмі різноманітна і поширюється на весь метаболізм. Насамперед з фосфором пов'язаний ріст і розвиток організму, цілісність кісткової тканини і зубів. Фосфор входить до складу універсальної енергетичної субстанції – АТФ, таких макроергічних сполук, як креатинфосфат, -1, -3-дифосфогліцерінова кислота, енолфосфопіровиноградна кислота, сукцинат-фосфат тощо. Фосфор є складовою фосфоліпідів. Солі фосфорних кислот утворюють фосфатну буферну систему. Залишок фосфорної кислоти входить до складу мононуклеотидів ДНК і РНК. Внутріклітинний медіатор

У-АМФ, який скеровує реакції в енергетичний чи пластичний обмін також збудований за участю фосфорної кислоти. В організмі фосфор засвоюється добре разом із кальцієм, але ідеальне їх співвідношення $P:Ca = 1:1,5$. Їх надмір пригнічує всмоктування Mg .

Нормальні величини фосфору в сироватці крові людини такі:

- $P_{\text{неорг}}$ – 1-2 ммоль/л;
- $P_{\text{кислоторозчинний}}$ – 7-14 ммоль/л;
- $P_{\text{ліпідний}}$ – 2-3,5 ммоль/л.

Фосфор є нормальною складовою сечі і його екскреція становить 1–5г/добу.

Принцип методу. Фосфор легко утворює сполуку фосформолібденової кислоти при взаємодії з молібденовокислим амонієм. Під час відновлення фосформолібденової кислоти аскорбіновою кислотою утворюється суміш різних оксидів молібдену, так звана «молібденова синь». Інтенсивність її забарвлення пропорційна до концентрації фосфору неорганічного і її колоримерують на ФЕКу при довжині хвилі 560 нм (червоний світлофільтр).

Реактиви: набір реактивів для визначення неорганічного фосфору.

Прилади і матеріали: фотоелектроколориметр пробірки, піпетки, дозатори піпеткові, ємності для збору сечі.

Хід роботи

У мірній колбі 0,5 мл сечі розводять дистильованою водою до 50 мл. Звідси набирають 2 мл, додають 1 мл молібденової суміші (“А” (60% H_2SO_4) – 3 мл +”Б” (8,3% розчин амонію молібденовокислого) – 2 мл) і 2 мл аскорбінової кислоти. Через 10 хв колориметрують на ФЕКу (при 560 нм – червоний світлофільтр) і визначають фосфор за калібрувальною кривою. Результат калібрувальної кривої множать на 0,0229 і отримують г% P_2O_5 , а потім перераховують на добовий діурез.

Нульову позначку встановлюють за компенсаційною рідиною, яка містить 2 мл H_2O , 1мл молібденового реактиву і 2 мл аскорбінової кислоти.

Клініко-діагностичне значення

Концентрація фосфору неорганічного у крові та його екскреція збільшується при нирковій недостатності, гіпараміреозидизмі, передозуванні вітаміну Д. Явище спостерігають у сечі також при лейкемії, інфекційних захворюваннях.

Зменшений уміст фосфору неорганічного наявний за умов порушення всмоктування, при рахіті, ниркових захворюваннях. При гіперліпопротеїнемії вміст ліпідного фосфору збільшується.

Контрольні питання

1. Яка біологічна роль фосфору неорганічного в організмі?
2. До складу яких сполук в організмі входить фосфор?
3. У яких обмінах речовин бере участь фосфор?
4. Яка роль вітамінів і гормонів у регулюванні обміну фосфору неорганічного?
5. Які нормальні величини фосфору неорганічного та його різновиди?
6. Принцип методу визначення фосфору неорганічного в крові та сечі.
7. Яке клініко-діагностичне значення фосфору неорганічного?

Ситуаційні завдання

1. Уміст фосфору в крові становить 5 ммоль/л. Чи відповідає це нормі? Причини цього стану.

2. Уміст фосфору в крові становить 2 ммоль/л, а кальцію – 2,1 ммоль/л. Який елемент не відповідає правильному співвідношенню між ними? І як його збалансувати?

Лабораторна робота №5
Визначення креатиніну в сечі
Теоретичний вступ

Одним із кінцевих продуктів азотого обміну організму є креатинін. Він утворюється із креатин фосфату і є складовою сечі.

У нормі зі сечею доросла людина виділяє 1-2 г за добу (8,8-17,7 ммоль /добу у чоловіків і 7,1-15,9 ммоль/добу у жінок). Межі коливання залежать від стану мускулатури. Для кожної людини кількість видаленого креатиніну є сталою і віддзеркалює її м'язову масу.

Креатиніновий коефіцієнт для чоловіків складає 18-32 мг на кожний 1 кг маси тіла за добу, для жінок – 10-25 мг. Цей показник невисокий у повних і худорлявих людей, але високий в осіб із розвиненою мускулатурою.

Визначення креатиніну в сечі проводять для дослідження функцій нирок.

Оскільки синтез креатину, з якого утворюється креатинін, відбувається в нирках і печінці, при тяжких ураженнях цих органів кількість креатиніну в сечі зменшується. Крім того, концентрація креатиніну в сечі може зменшуватися у хворих із послабленням білкового обміну (наприклад, при атрофії м'язів).

Креатинін не реабсорбується з первинної сечі в каналцях нефронів, тому кількість креатиніну відображає величину клубочкової фільтрації. У пацієнтів із хворими нирками зменшується виділення креатиніну зі сечею, а вміст його у крові збільшується.

Підвищення вмісту креатиніну в сечі спостерігається і при захворюваннях, які супроводжуються руйнуванням білків (інфекційні хвороби, інтоксикації, викликані деякими отруйними речовинами).

При втраті білкової маси унаслідок тривалого негативного азотого балансу виділення креатиніну зменшується, а креатину збільшується. Однак, сумарне виділення речовин залишається загалом постійним (цукровий діабет, гіпертиреоз, лихоманка, голодування).

Визначення креатиніну в сечі проводять для дослідження функції нирок та впливу фізичних навантажень на організм спортсмена. Креатинфосфат, з якого походить креатинін, відіграє крім функції алактатного анаеробного

енергоджерела – функцію переносія енергії з мітохондрій у міжфібрилярний простір. Від цього безпосередньо залежить м'язова швидкодія і сила як така. Тому внаслідок гіперфункцій креатиніну може бути сповільнений відновний синтез креатинфосфату, відтак і наявність макроергічних фосфагенів буде знижена. Це впливає на скоротливість м'яза та його релаксаційний період. Тому ознаки щодо обміну креатинфосфату супроводжують міопатії різної етіології.

Принцип методу. При взаємодії креатиніну з пікриною кислотою у лужному середовищі утворюється сполука помаранчевого кольору, інтенсивність забарвлення якої пропорційна до концентрації креатиніну в сечі.

Реактиви: набір реактивів для визначення сечовини.

Прилади і матеріали: фотоелектроколориметр, мірні циліндри, штативи з пробірками, дозатори піпеткові, піпетки, ємності для збирання сечі.

Хід роботи

Перед аналізом біологічний матеріал (сечу) розвести в 100 разів (до 1 мл сечі додати 99 мл води або 0,1 мл сечі + 9,9 мл води).

У три різні пробірки з точністю відмірюють (табл. 2.1) всі необхідні розчини речовин.

Таблиця 2.1

Розчини речовин для визначення креатиніну в сечі

№ з/п	Вимірювана рідина	Дослідна	Холоста	Калібрувальна
1.	Калібрувальна рідина	–	–	2,0
2.	Розведена сеча	1,0	–	–
3.	Розчин ТХО кислоти	0,5	0,5	–
4.	Дистильована вода	0,5	1,5	–
5.	Розчин їдкого натру	1,0	1,0	1,0
6.	Розчин пікринової кислоти	1,0	1,0	1,0

Перемішати, витримати 20 хв при кімнатній температурі, фотометрувати навпроти холостої проби при 500-560 нм (синьо-зелений світлофільтр). Отриманий результат помножити на коефіцієнт розведення 100.

Концентрацію креатиніну розраховують за формулою:

$$C = 2,0 \times \frac{E_{\text{досл}}}{E_{\text{кал}}} \text{ (мг\%)} \quad \text{або} \quad C = 117 \times \frac{E_{\text{досл}}}{E_{\text{кал}}} \text{ (мкмоль/л)}$$

C – уміст креатиніну в пробі;

2,0 (177) – калібрувальна концентрація креатиніну;

$E_{\text{досл}}$ – оптична густина дослідної проби;

$E_{\text{кал}}$ – оптична густина калібрувальної проби.

Кількість креатиніну в добовій сечі визначають за формулою:

$$KK = \frac{C \times A}{B \times 100}$$

KK – кількість креатиніну в добовій сечі у мг ,

C – концентрація креатиніну в сечі у мг%,

A – добова кількість сечі у мг.

B – кількість сечі взятої для аналізу в мл.

Норма креатиніну в сечі:

Дорослі чоловіки – 14-26 мг/кг/добу (124-230 мкмоль/кг/добу)

жінки – 11-20 мг/кг/добу (97-177 мкмоль/кг/добу)

Добова сеча здорової людини – 4,4-17,7 ммоль/добу.

Клініко-діагностичне значення

Визначення креатиніну в сечі проводять для дослідження функції нирок. Збільшення виділення креатиніну зі сечею (гіперкреатинінурія) спостерігають при надмірному споживанні м'ясної їжі, при забоях тканин м'язів, інтенсивній м'язовій роботі, після зняття кровозупинного джгута, лихоманці, пневмонії. Понижений уміст креатиніну в сечі (гіпокреатинінурія) виявляють при хронічному нефриті з уремією (нирковій недостатності), м'язовій атрофії, дегенерації нирок, лейкемії у літніх людей .

Контрольні запитання

1. Походження креатиніну в сечі.
2. Норми екскреції креатиніну в сечі у чоловіків і жінок.
3. Гіперкреатинінурія та значення цього біохімічного маркера в діагностиці захворювань.
4. Гіпокреатинінурія та значення біохімічного маркера в діагностиці захворювань.

5. Клініко-діагностичне значення визначення креатиніну.
6. Принцип методу біохімічного визначення креатиніну в сечі.
7. За якою формулою вираховують концентрацію креатиніну в сечі?
8. Роль креатиніну у діагностиці стану енергообміну.

Ситуаційні завдання

1. Унаслідок голодування у пацієнта спостерігають негативний азотовий баланс. Чому? І який при цьому вміст креатиніну у сечі у порівняно з нормою?
2. Міопатії супроводжуються астеною локальною або глобальною. Якою буде екскреція креатиніну зі сечею? Чи можна використовувати цей показник для моніторингу прогресування захворювання.
3. У пацієнта виявили гіперкреатинінурію. Що можна передбачити стосовно енергобалансу серцевого м'яза?
4. У пацієнта гіпокреатинінурія і гіперкреатинінурія. Що слід очікувати стосовно роботи нирок?

Лабораторна робота №6

Визначення гемоглобіну в крові.

Теоретичний вступ

Одним із найважливіших білків для людей і тварин є гемоглобін. Він у складі еритроцитів переносить із кров'ю кисень від легень до тканин, а з тканин до легень – вуглекислий газ. Належить до складних білків – хромопротеїдів. Складається гемоглобін з білка глобіну, два α - і два β - ланцюгів та небілкової частини – гему. Останній надає гемоглобінові червоного забарвлення, бо має у своєму складі Fe^{2+} .

Приєднання до гему різних хімічних груп супроводжується зміною забарвлення. Це дає можливість визначити концентрацію гемоглобіну в крові.

Сполука гемоглобіну з киснем називається оксигемоглобіном. Саме його концентрацію визначають. У здорових людей вона становить 120-140 г/л у жінок, у чоловіків – 132-164 г/л за міжнародною системою одиниць СІ.

Другим похідним гемоглобіну є карбгемоглобін. Він утворюється при взаємодії Hb із CO_2 .

Наступним похідним гемоглобіну є карбоксигемоглобін (Hb CO). Це сполука гемоглобіну з чадним газом. Вона значно міцніша, ніж оксигемоглобін. При одночасному вдиханні суміші кисню і чадного газу в крові переважно буде утворюватися карбоксигемоглобін. Причиною цього є те, що оксигемоглобін легко дисоціює і кисень легко витісняється чадним газом, який є особливо токсичним для організму.

Реакція утворення Hb CO зворотна за умов високої концентрації кисню. Тому при отруєнні чадним газом потерпілого треба виносити на свіже повітря.

Зниження умісту гемоглобіну в крові характеризує собою анемію, а різке зменшення його несумісне з життям як наслідок кисневого голодування та порушення обміну в тканинах. Значне зниження гемоглобіну характерним є при різких утратах крові.

Гемоглобінопатії поділяють на 2 групи: якісні (гемоглобінози), що включають в себе заміну амінокислот і кількісні – порушення, відомі під назвою таласемії. Відомо такі різновиди гемоглобінозів:

– HbF – фетальний гемоглобін, характерний для гемоглобіну плоду людини, і який упродовж 3 місяців після народження дитини зникає і перетворюється в HbA, характерний для здорової людини. У випадку вади його концентрація в крові дорослої людини збільшується в 10-20 разів, що виражається у гіпоксії внаслідок нездатності HbF транспортувати кисень.

– HbS – мутантний гемоглобін, у β -ланцюгах в положенні 6 замість глютамінової кислоти наявна амінокислота валін. Такий гемоглобін злипається у агрегати серпоподібного вигляду, а хвороба носить назву серповидної анемії.

– HbC – аномальний гемоглобін, у молекулі якого існує заміна залишку глютамінової кислоти в 6 положенні β -ланцюга на лізин. Такий гемоглобін сприяє гемолізу еритроцитів.

– HbM – така група гемоглобінів M характеризується нестачею у місцях з'єднання з залізом гему, внаслідок чого Fe^{3+} не може відновлюватися до Fe^{2+} . Такий гемоглобін (його ще називають метгемоглобін) не може транспортувати кисень.

– HbF_{1c} – це форма гемоглобіну, з'єданого з вуглеводами, так званий глікозильований. Він з'являється в еритроцитах за умов некомпенсованого цукрового діабету.

Таласемії виникають унаслідок утворення аномальних форм гемоглобінів, у гробіновій частині яких відсутній α - або β -поліпептидний ланцюг.

Принцип методу. При взаємодії гемоглобіну з червоною кров'яною сіллю відбувається його окиснення до метгемоглобіну при наявності ацетону ціангідрин утворює ціанметгемоглобін червоно-бурого кольору, інтенсивність забарвлення якого пропорційне до вмісту гемоглобіну.

Реактиви:

- 1) набір реактивів для визначення гемоглобіну в крові;
- 2) трансформуючий розчин: 0,5 мл ацетонціангідрину, 200 мг червоної кров'яної солі, 1 г гідрокарбонату натрію розчиняємо в 1 л дистильованої води.

Розчин стабільний при кімнатній температурі впродовж кількох місяців при його зберіганні в темній посудині;

3) стандартний розчин: гемоглобінціанід з концентрацією 59,75 мг/% в крові 150 г/л.

Прилади і матеріали: фотоелектрикоколориметр, мірна колба 1 л пробірки, піпетки 0,02, 0,2 і 5 мл

Хід роботи

Дослідна проба: 0,02 мл крові добре перемішують, щоб не утворилася піна, з 5 мл трансформуючого розчину, витримують 15 хв і фотоколориметрують навпроти трансформуючого розчину (520-550 нм – зелений світлофільтр, кювета товщиною 1 см).

Калібрувальна проба: вимірюють екстинцію калібрувального розчину гемоглобінціаніду навпроти трансформуючого розчину (оптична густина – відповідає пробі крові з умістом гемоглобіну 150 г/л)

Уміст гемоглобіну розраховують за формулою:

$$C = 150 \times \frac{E_{\text{досл}}}{E_{\text{кал}}} \text{ г/л} \quad \text{де,}$$

C – концентрація гемоглобіну в крові;

E_{досл} – оптична густина дослідної проби

E_{кал} – оптична густина калібрувальної проби

Норма – 132-164 г/л для чоловіків; 120-140г/л – для жінок.

Клініко-діагностичне значення

Знижений гемоглобін крові характерне для анемії. Різке зниження гемоглобіну несумісне з життям, як наслідок кисневого голодування і порушення обміну речовин. Значне зниження гемоглобіну характерне також при кровтратах, гіпопластичній анемії, гемолітичній анемії. Збільшується гемоглобін у крові при еритремії, серцевій декомпенсації, мієлопроліферативних захворюваннях.

Контрольні питання

1. Будова гемоглобіну в нормі та при патологіях.
2. Різновиди гемоглобінів.

3. Патологічні форми гемоглобінозів.
4. Таласемії та їх різновиди.
5. Уміст гемоглобіну в нормі у чоловіків і жінок.
6. Принцип методу визначення гемоглобіну.
7. За якою формулою розраховують уміст гемоглобіну в крові?
8. Клініко-діагностичне значення визначенню гемоглобіну.

Ситуаційні завдання

1. Під час народження дитини виявили гіпоксію тканин. Який різновид гемоглобінозу передусім наявний?
2. Виявлено гемоліз еритроцитів. Який різновид гемоглобінозу причетний до цієї патології, як приклад взаємозаміщення яких амінокислот наявне?
3. У пацієнта виявлено серповидну анемію. Яка мутація у якого різновиду гемоглобінозу причетна до цієї патології?
4. Чому у гемоглобіні М наявне залізо трьохвалентне і чому воно не відновлюється до двохвалентного?
5. У пацієнта цукровий діабет. Яка форма гемоглобінозу до цього причетна і який механізм виникнення такої патології?
6. У хворого виявили таласемію. Яку частину гемоглобіну треба проаналізувати (білкову чи небілкову) аби ідентифікувати форму таласемії?
7. Спостерігається тривале зниження гемоглобіну крові. Підозра на який діагноз може бути з огляду на це?
8. Виявили збільшений уміст гемоглобіну в крові. Клінічний діагноз яких хвороб цьому відповідає і чому?

Лабораторна робота №7

Визначення аскорбінової кислоти в сечі

Теоретичний вступ

Вітамін С найменш стійкий з водорозчинних вітамінів. Фізіологічне значення вітаміну С тісно пов'язане з його окисно-відновними властивостями. Можливо, що цим слід пояснювати і зміни у вуглеводному обміні при його дефіциті, які полягають у поступовому зниженні вмісту глікогену в печінці і, спочатку підвищеному, а потім зниженому вмісті цукру в крові. Посилюється також розпад м'язового білка, а в сечі з'являється креатин. Велике значення має вітамін С для утворення колагену та забезпечення головної функції сполучної тканини.

Авітамінози та гіповітамінози можуть виникнути в результаті таких процесів:

- 1) відсутності або недостатнього вмісту вітаміну С у їжі;
- 2) порушення процесів усмоктування вітаміну С у шлунково-кишковому тракті;
- 3) особливого стану організму (посилена робота, ріст дитячого організму, вагітність, важкі гострі та хронічні захворювання).

Вітамін С швидко руйнується окисниками, утворюючи щавлеву і трифенову кислоти, особливо при нагріванні в нейтральному та лужному середовищах, під час активної дії ультрафіолетового випромінювання. В організмі людини спостерігають сезонний коливний характер С-вітамінного забезпечення. Особливо низький уміст вітаміну характерний ранньою весною. Це пов'язано із зниженим умістом вітаміну С у продуктах рослинного походження. Ця обставина вимагає уживання вітаміну С у вигляді вітамінних фармакологічних препаратів або додаткового введення у харчовий раціон продуктів, у яких він зберігається впродовж цілого року: шипшина, смородина, цитрусові. У кислому середовищі аскорбінова кислота найбільш стійка. Сама кислота і продукт її розпаду із організму виводяться зі сечею. Вітамін С є складовою водної фази антиоксидантної системи, яка забезпечує захист

організму від згубного впливу радикалів ендogenous чи екзогенного походження. Саме ця роль вітаміну С узалежнює організм від його нестачі і викликає у ньому низку деструктивних процесів.

Широке застосування знайшов спосіб виявлення забезпеченості організму вітаміном С шляхом визначення кількості міліграмів екскреції вітаміну з сечею за 1 годину. Враховують виділення вітаміну зі сечею, зібраною натще впродовж 1 години.

У практично здорових людей за 1 год виділяється 1-2 мг аскорбінової кислоти.

У нормі за добу виділяється 20-30 мг або 113,55-170,33 мкмоль аскорбінової кислоти.

Принцип методу: виявлення вітаміну С ґрунтується на окисно-відновних властивостях аскорбінової кислоти.

Реактиви: 1 N HCL,

0,01 N розчин йоду,

1% розчин крохмалю.

Прилади і матеріали:

1) конічні колби;

2) піпетки 5мл.

Хід роботи

У дві колбочки відмірюємо по 25 мл сечі додаємо 10 мл 1 N HCL, 2 мл крохмалю і титруємо кожну пробу 0,01 N розчин йоду до появи незникаючого впродовж 30 с синього забарвлення. Одна молекула аскорбінової кислоти еквівалентна 2 атомам йоду. Отже, 1 мл 0,01 N розчину йоду еквівалентний 0,88 мг аскорбінової кислоти. Перераховують на добовий діурез за формулою:

$$X=0,88AB/C,$$

де

X – кількість аскорбінової кислоти (мг/добу);

0,88 – коефіцієнт перерахунку отриманих результатів в одиниці маси (1

мл

0, 01N розчину йоду еквівалентний 0,88 мг аскорбінової кислоти;

C – об'єм сечі, взятий для титрування;

B – середня добова кількість сечі – діурез (1400 для чоловіків і 1200 для жінок);

A – результат титрування 0,01N I₂ (мл).

Клініко-діагностичне значення

Знижений уміст аскорбінової кислоти спостерігають при гіповітамінозі C як результат сезонних коливань, при збідненій на вітамін C дієті, при тривалому голодуванні. Авітаміноз (відсутність) C викликає цингу, порушення обміну речовин, патології, що пов'язані з порушенням антиоксидантної системи.

Контрольні питання

1. Вітаміни. Їх класифікація. Роль в організмі.
2. Коферментна функція вітамінів.
3. Захворювання, що пов'язані з гіпофункцією водорозчинних вітамінів.
4. Захворювання, які пов'язані з гіпо- чи гіперфункцією жиророзчинних вітамінів.
5. Авітамінози. Їх різновиди та захворювання, викликані авітамінозом.
6. Етіологія авітамінозу.
7. Вітамін C, його роль в організмі.
8. Антиоксидантна роль аскорбінової кислоти.
9. Принцип методу кількісного визначення вітаміну C.
10. За якою формулою визначають екскрецію вітаміну C.
11. Метод титрування, як його застосовують.

Ситуаційні завдання

1. У хворого діагностували цингу. З яким авітамінозом це пов'язано? Як лікувати цю недугу?
2. Весною спостерігають гіповітаміноз C. Як його усунути?
3. Під час відпустки у південні широти посилюється антиоксидантна роль вітаміну C. Чому? Як це забезпечити?

4. Весною спостерігають понижений уміст вітаміну С у продуктах харчування. Чому? Які продукти зберігають його на майже незмінному рівні незалежно від сезону?

5. При м'язовій дистрофії виявили гіпофункцію вітаміну С. Чому? Чи можливо скорегувати цю ситуацію і яким чином?

Лабораторна робота № 8

Біохімічне дослідження сечі

Теоретичний вступ

Основною функцією нирок є видалення із організму кінцевих продуктів обміну речовин і підтримання постійності фізичних властивостей і хімічного складу крові (гомеостазу).

Біохімічне дослідження сечі має суттєве значення у спортивній практиці. Воно дозволяє міркувати про те, як протікають процеси обміну речовин в організмі спортсмена та про його реакцію на різні фізичні навантаження. Крім цього, дослідження сечі – важливий діагностичний засіб на випадок хвороби.

За добу людина виділяє від 1,2 до 1,5 л сечі. Найбільше в сечі води, причому різного походження:

- а) введеної в організм із продуктами харчування;
- б) утвореної при окисненні в організмі органічних сполук.

У воді розчинені різні кінцеві і проміжні продукти обміну, а також мінеральні солі.

Колір сечі залежить від умісту в ній пігментів – урохрому, уробіліну й інших. Для якісного аналізу беруть ранкову сечу.

При аналізі сечі спочатку визначають її фізичні показники (колір, запах, прозорість, питому вагу), потім хімічні (реакцію на вміст у ній нормальних і патологічних складових).

Питома вага сечі коливається в межах 1,010-1,025 г/см³ залежно від величини діурезу (сечовиділення і хімічного складу). Підвищення питомої ваги може бути пов'язане з появою в ній незвичайних складових, наприклад цукру.

Реакція сечі у звичайних умовах слабокисла (рН: 6,5-6,0). При вживанні м'яса у великій кількості вона стає ще кислішою, при рослинному ж харчуванні – слаболужною (рН – 8,0). Інтенсивна м'язова діяльність призводить до різкого зсуву реакції сечі в кислоту сторону, внаслідок виділення недоокислених продуктів, які утворюються в м'язах (молочна, піровиноградна, ацетооцтова кислоти й інші).

У гірських умовах, а також при різних захворюваннях реакція сечі може бути більш лужною.

При м'язовій діяльності, особливо інтенсивній, уміст звичайних складових сечі збільшується, а також з'являються незвичайні метаболіти обміну.

Звичайними (нормальними) складовими частинами сечі є сечовина, креатинін, солі сечової і щавелевої кислот, іони Cl^- , Na^+ , NH_4^+ , PO_4^- (табл. 2.2).

Таблиця 2.2

**Хімічний склад сечі людини (питома вага 1,010-1,025; рН 5,0-7,0)
(добова сеча)**

№ п/п	Компоненти	у грамах
1.	вода	1100 – 1600
2.	сечовина	20 – 30
3.	сечова кислота	0,3 – 1,2
4.	креатинін	1,5 – 2,5
5.	гіппурова кислота	0,1 – 2,0
6.	пірвиноградна кислота	сліди
7.	молочна кислота	сліди
8.	індикан	0,001 – 0,038
9.	неорганічні речовини:	15 – 25
10.	C-	5 – 11
11.	PO-4	2 – 6,6
12.	O2	1,8 – 2,6
13.	Na+	3 – 5,2
14.	NH+4	0,6 – 1,3
15.	Ca2+	0,2 – 0,3
16.	Mg++	0,006 – 0,2

Незвичайними складовими є:

– білок, який з'являється після значних фізичних навантажень (спортивна бумінурія) і при захворюваннях нирок;

– цукор, як наслідок значного збільшення вмісту у крові (аліментарна гіперглікемія, пов'язання зі значним емоційним збудженням чи захворюванням на цукровий діабет);

– кетонові тіла, які з'являються у сечі при неповному їх окисненні в тканинах (в умовах гір, при нестачі вуглеводів у харчуванні, при цукровому діабеті);

– жовчні пігменти і жовчні кислоти (при захворюваннях печінки);

– кров'яні пігменти (при посиленому руйнуванні еритроцитів в організмі), індикан, уробілін та інші.

Реактиви: 10% розчин їдконого натру, лакмусовий папір, універсальний індикатор, насичений розчин пікринової кислоти, 5% розчин азотної кислоти, 3% розчин молібденовокислого амонію, насичений розчин щавлевокислого амонію, 20% розчин сульфосаліцилової кислоти, реактив Фелінга, 80% розчин оцтової кислоти, 10% розчин нітропрусиду натрію, концентрований аміак.

Прилади і матеріали: урометри, мірні циліндри на 50 мл, штативи з пробірками, спиртівки, паперові фільтри.

I. Визначення фізичних показників у сечі

1. Колір.

2. Прозорість.

3. Запах.

4. Питома вага.

У мірний циліндр об'ємом 50 мл наливають досліджувану сечу. Колір і прозорість визначають візуально, використовуючи таку термінологію: безбарвна, світло-жовта, шафранно-жовта, жовто-рожева, криваво-червона, червоно-бура, бура, зеленувато-бура, прозора, мутнувата, мутна.

Запах визначають за допомогою термінів – нормальний, аміачний, плодовий, (при наявності ацетону) і тому подібне.

Питому вагу визначають за допомогою спеціального аерометра (урометра). Урометр обережно опускають у циліндр із сечею (на її поверхні не повинно бути піни) так, щоби він не торкався стінок циліндра, і за нижнім меніском сечі зчитують цифру на шкалі урометра.

Спочатку вимір проводять одним урометром (від 1,0 до 1,03). Якщо ж питома вага сечі більша (тоді урометр спливає), беруть другий урометр зі шкалою від 1,03 до 1,06 г/см³.

Фізичну характеристику сечі записують.

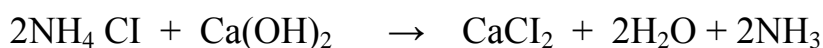
II. Виявлення нормальних складових сечі

I. Визначення рН сечі.

У сечу занурюють лакмусовий папір: почервоніння свідчить про кислу, а посиніння – про лужну реакції. Для точнішого визначення реакції використовують індикаторний папір, який по-різному змінює забарвлення залежно від активної реакції середовища. До паперу прикладається шкала, за якою і визначають рН сечі.

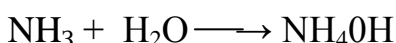
2. Визначення солей амонію у сечі.

У пробірку наливають 2 мл сечі, додають 4 краплі вапняного молока $\text{Ca}(\text{OH})_2$ і злегка нагрівають, закріпивши за верхній край пробірки зволожений у воді лакмусовий папірець. Через деякий час він синіє.



3. Визначення сечовини в сечі.

У пробірку наливають 2 мл сечі, додають 6 крапель 10% розчину NaOH і обережно кип'ятять. За верхній край пробірки закріплюють зволожений водою лакмусовий папірець. При гідролізі сечовини виділяється аміак, який і веде до посиніння зволоженого лакмусового паперу.



4. Визначення креатиніну в сечі.

У пробірку наливають 1 мл сечі, додають 4 краплі 10% розчину NaOH і стільки ж насиченого розчину пікринової кислоти. З'являється яскраве оранжеве забарвлення.

5. Визначення фосфатів у сечі.

У пробірку наливають 1-мл сечі, підкислюють її 2-3 краплями азотної кислоти, додають 2 мл 3% розчину молібденовокислого амонію і нагрівають. Поступово утворюється жовтий осад фосфорномолібденовокислого амонію.

6. Визначення іонів кальцію у сечі.

У пробірку наливають 2 мл сечі і додають 4 краплі насиченого розчину щавелевокислого амонію. Відразу випадає осад щавелевокислого кальцію.

III. Виявлення незвичайних складових сечі

1. Визначення білка у сечі.

у нормі білок у сечі відсутній. Він з'являється в ній після значних фізичних навантажень (спортивна альбумінурія), а також при захворюваннях нирок і сечовидільних шляхів.

А. Проба з концентрованою азотною кислотою.

У пробірку наливають 2-3 мл концентрованої HNO_3 і (обережно!) по стінці нашаровують за допомогою піпетки такий же об'єм сечі. При наявності в сечі білка на межі рідин утвориться мутне біле кільце.

Б. У пробірку наливають 5 мл сечі і додають 10 крапель 20% розчину сульфосаліцилової кислоти. При наявності в сечі білка з'являється осад або помутніння. Реакція вдвічі чутливіша, ніж попередня.

2. Визначення глюкози в сечі.

Сеча здорової людини містить незначну кількість глюкози. Підвищення кількості глюкози в сечі може спостерігатися тоді, коли вміст її у кров'яному руслі перевищує 8–9 ммоль/л. Тому ця величина називається "нирковим порогом глюкози".

У пробірку наливають 2 мл профільтрованої (якщо лужна) сечі, додають 1 мл реактиву Фелінга 1 і 1 мл реактиву Фелінга 2. Нагрівають за наявності цукру при кипінні суміші з'являється цегляно-червоне забарвлення закису міді Cu_2O .

3. Визначення кетонових тіл у сечі.

У нормі добова сеча містить 20-50 мг кетонових тіл. Кетонурія спостерігається при голодуванні, надмірному вживанні жирів, різкому послабленні серцевої діяльності.

Кетонові тіла з'являються у сечі при порушенні окиснення їх у тканинах.

У пробірку наливають 10 мл сечі, додають 1 мл 80% розчину оцтової кислоти і 0,5 мл свіжоприготованого 10% розчину нітропрусиду натрію. Тоді (обережно!) нашаровують 2 мл концентрованого аміаку. При наявності в сечі кетонових тіл утворюється фіолетове кільце на стику рідин.

Клініко-діагностичне значення

Вихід за межі норми екскретованих нормальних складових сечі слугує сигналом порушення обміну тих чи інших речовин, надміру їх у їжі чи нестачі. Поява білка у сечі (альбумінурія) характерна при інтенсивній м'язовій дистрофії, перенасиченій білковим компонентом їжі, при захворюваннях нирок тощо. Поява цукру в сечі (глюкозурія) може мати аліментарне походження. Таке явище виявляють під час стресу, фізичних навантажень. Поява в сечі кетонових тіл (кетонурія) спостерігається під час неповного окиснення жирів (в умовах гір, при браку вуглеводів у харчуванні, при цукровому діабеті).

Контрольні питання

1. Назвіть нормальні складові сечі.
2. Як змінюється реакція сечі залежно від складу їжі?
3. Як відбивається на питомій вазі сечі поява у ній цукру?
4. Які речовини можна виявити у сечі після інтенсивної м'язової роботи?
5. Чи можна робити висновки про рівень обміну речовин в організмі за появою незвичайних компонентів у сечі?
6. За якими показниками сечі можна аналізувати характер азотистого балансу?
7. Поясніть механізм спортивної альбумінурії.
8. Про що свідчить явище глюкозурії?

Ситуаційні завдання

1. У пацієнта виявили альбумінурію. Що це за патологія і які причини її викликають?
2. У хворого в сечі виявили кетонові тіла. Про порушення якого обміну речовин це свідчить?
3. У сечі виявили цукор. Як називається це явище? Які причини можуть викликати його?

Лабораторна робота №9

Аналіз активної реакції середовища біологічних рідин під дією фізичних навантажень

Теоретичний вступ

Навантаження високої інтенсивності, що супроводжуються активним гліколізом, а отже, і різким підвищенням молочної кислоти в крові, ведуть до зменшення лужного резерву крові. Однак, у зв'язку з тим, що буферність крові достатньо велика, суттєво змін рН крові, як звичло, не відбувається. Ацидоз (нагромадження у крові речовин кислотного характеру) залишається компенсованим. Інша картина спостерігається у біологічних рідинах, таких як сеча і слина. Вони володіють меншою буферністю, ніж кров. Від дії кислоти величина рН у них зменшується. Активна реакція сечі у стані спокою слабкокисло. При навантаженнях інтенсивного характеру кислотність сечі збільшується. Також за умов харчування, перенасиченого м'ясними продуктами, рН сечі змінюється в кислу сторону. Це, звісно, обумовлено надлишком амінокислот, що виводиться назовні. При харчуванні, що ґрунтується на вегетаріанстві, рН сечі має слаболужні характеристики. Такий стан сечі може бути обумовлений перебуванням у гірських умовах, також при певних захворюваннях.

Аналогічні зміни рН спостерігаються і в такій біологічній рідині як слина. Фермент амілаза має оптимум дії рН 6,8, тобто слабкокисло середовище. Під час інтенсивних тренувальних навантажень спостерігаються зсуви, зокрема в кислу сторону, як ефект ацидозу.

Принцип методу ґрунтується на зміні кольору індикатора чи індикаторної смужки, просоченої відповідним барвником. У зв'язку з накопиченням кислих іонів H^+ чи лужних іонів OH^- індикатор змінює свій колір, який можна ідентифікувати за допомогою шкали водневого показника рН.

Реактиви: біологічний матеріал, дистильована вода.

Прилади і матеріали: колбочки, пробірки, скляні палочки, універсальний індикаторний папір, експрес-набори «Пентафан», «Кетофан», «Альбуфан», «Глюко-тест» (фірма «Lachema», Чехія).

Хід роботи

У хімічні посудини забирають біологічний матеріал перед фізичним навантаженням на велоергометрі (проба «vita maxima»), після фізичного навантаження та в період відновлення. Велоергометричне навантаження починають із 50 Вт додаючи щохвилини 50 Вт при педалюванні: 75-80об/хв для хлопців і 65-70 об/хв для дівчат.

Після навантаження забір сечі проводять не раніше, ніж через 30 хв, та через годину після фізичного навантаження. Результати вимірювання записують і будують графік динаміки активної реакції біологічних рідин відносно стану спокою.

Клініко-діагностичне значення

pH біологічних рідин має важливе значення при визначенні стану кислотно-лужної рівноваги. В умовах ацидозу його показник знижується ($\text{pH} < 7$), а в умовах алкалозу – збільшується ($\text{pH} > 7$). Різке падіння pH спостерігають при інфаркті міокарда, а різке піднімання pH – під час енцефалопатії печінкової етіології, що пов'язана з порушенням функції печінки щодо детоксикації аміаку і кетонових тіл.

Контрольні питання

1. Що таке активна реакція середовища?
2. Що розуміємо під поняттями ацидозу й алкалозу?
3. При яких навантаженнях відбувається зсув pH в кислий бік, а при яких – у лужний?
4. Яка роль буферних систем у забезпеченні кислотно-лужної рівноваги?
5. Типи буферних систем.
6. Яке pH крові у нормі?
7. Значення pH сечі в нормі та при патологіях.

Ситуаційні завдання

1. Під впливом фізичних вправ рН сечі змінився у кислий бік. Якого характеру було це навантаження?
2. Під впливом фізичних вправ рН сечі змінився у лужний бік. Якого характеру було це навантаження?
3. буферні системи є різного типу. Буферна ємність якої з їх різновидів є найбільшою і чому?
4. З якою клінічною метою застосовують як функціональну пробу ступінчасте навантаження на велоергометрі «vita maxima»?
5. Як зміниться активна реакція біологічних рідин і чому під час застосування велоергометричної проби PWC_{170} ?
6. Які біохімічні показники є інформативними в експрес-контролі біологічних рідин при застосуванні функціональних проб з допомогою велоергометра і їх зміни при різних патологіях?

Лабораторна робота №10

Визначення сечовини у сечі

Теоретичний вступ

Сечовина – це кінцевий продукт обміну білків. Це речовина, що утворюється як продукт утилізації аміаку, що накопичується внаслідок реакцій окисного дезамінування амінокислот. Цей процес відбувається в орнітиновому циклі і переважає у гепатоцитах печінки. Через нирки сечовина у кількості 20-25 г на добу екскретується зі сечею.

За умов підвищеного енергетичного запиту аеробного типу, коли білки активно залучаються як енергосубстрат, спостерігають посилене утворення аміаку, а відтак – підвищену екскрецію продукт детоксикації аміаку – сечовину.

Цей біохімічний показник називають універсальним показником втоми. Це пояснюється принципом гетерохронності залучення біосубстратів як енергоджерела. Спочатку окисненню підлягають вуглеводи, пізніше – жири і в кінці – білки. Тому й продукт повного розпаду білків – сечовина – засвідчує глибину деструктивних змін в організмі.

Зниження концентрації сечовини спостерігається за таких умов:

- обмеження білка в харчовому раціоні;
- порушення функції печінки (переродження і отруєння фосфором);
- при ацидозі, оскільки значна частина аміаку використовується для нейтралізації кислот;
- при ураженні нирок (нефрит);
- у період інтенсивного росту організму;
- уживання анаболічних препаратів.

Уживання великої кількості білкової їжі, а також захворювання, пов'язані з посиленим розпадом білків (цукровий діабет, злоякісні пухлини, деякі інфекційні захворювання), зумовлюють підвищення рівня сечовини у сечі.

Нагромадження сечовини характерне і при довготривалій роботі за рахунок підвищення концентрації аміаку у стомлених м'язах.

Принцип методу.

Сечовина утворює з діацетилмонооксимом за наявності тіосемікарбазиду і солей заліза в сильнокислому середовищі комплекс рожевого кольору, оптична густина якого прямо пропорційна концентрації сечовини в біопробі.

Реактиви:

набір реактивів для визначення сечовини. (фірма «Lachema», Чехія)

Прилади і матеріали: фотоелектроколориметр, водяна баня, ємності для збирання сечі, піпетки, пробірки звичайні, фольга або корки, таймер, маркер.

Хід роботи

У три різні пробірки з точністю відмірюють (табл. 2.3) усі необхідні розчини речовин.

Біологічний матеріал (сечу) перед дослідом обов'язково розвести в 50 разів (1 мл сечі + 49 мл води дистильованої). Перед кип'ятінням пробірки закривають алюмінієвою фольгою і витримують у водяній бані точно 10 хвилин. Після кипіння охолоджують у холодній воді і колориметрують навпроти холостої проби при довжині хвилі 520 нм (зелений світлофільтр).

Таблиця 2.3

Розчини речовин для визначення сечовини в сечі

№ з/п	Вимірювана рідина	Дослідна	Холоста	Калібрувальна
1.	Біологічна рідина розведена (сеча)	0,02	–	–
2.	Калібрувальна рідина (розчин готовий, стабільний)	–	–	0,02
3.	Фізіологічний розчин (NaCl – 0,9%)	–	0,02	–
4.	Розчин реактиву “А” (діацетилмонооксим)	2,0	2,0	2,0
5.	Розчин реактиву “Б” (розчин тіосемікарбазиду)	2,0	2,0	2,0

Концентрацію сечовини розраховують за формулою:

$$C = \frac{E_{\text{досл}}}{E_{\text{кал}}} \times 16,64 \times 50 = \text{ммоль/добу}$$

Норма сечовини в сечі: 333-583 ммоль/добу, 20-35 г/добу.

Клініко-діагностичне значення

Знижений уміст сечовини спостерігають при цирозі печінки, паранхімотозній жовтяниці, нефриті, ацидозі, уремії; підвищений – при білковому голодуванні, злоякісній анемії, гарячці, ракових захворюваннях різної етіології, після прийому саліцилатів, при отруєннях фосфором.

Контрольні питання

1. Кінцевим продуктом якого обміну є сечовини?
2. Чому сечовину називають універсальним критерієм втоми?
3. Клінічна причина підвищеного вмісту сечовини у сечі.
4. Коли спостерігають пониженої екскрецію сечовини?
5. Клініко-діагностичне значення показника сечовини в сечі
6. Принцип методу визначення сечовини.
7. Показник екскреції сечовини в нормі.
8. Як змінюється показник сечовини під впливом різних навантажень?

Ситуаційні завдання

1. У пацієнтів зафіксували рівень екскреції сечовини 980 ммоль/добу. Що може бути причиною такої картини? Чи слід вважати її патологічною?
2. У кваліфікованих ватерполістів після 7-8 денного турніру виявили посилену екскрецію сечовини. Це норма, патологія, передпатологічний стан, чи щось інше. Дати пояснення.
3. У пацієнта виявлено, що добовий рівень екскреції сечовини становить 150 ммоль/добу. Як трактувати таку ситуацію? Які рекомендації можна йому дати?

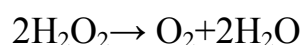
Лабораторна робота №11

Визначення активності каталази крові

Теоретичний вступ

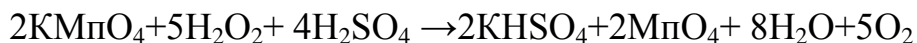
Ферменти, які каталізують окисно-відновні реакції, – оксидоредуктази – поділяються на дві групи: дегідрогени й оксидази. Перші віднімають електрони та протони від субстрату, який окиснюється, і передають їх на будь-який проміжний переносій водню у дихальному ланцюгу – нікотинамідаденін – динуклеотид (НАД), флавінаденін – динуклеотид (ФАД) й інші, але не на кисень. Інші передають електрони та протони на активований кисень (кисень в атомній формі – O), що веде до утворення води. Близькими до оксидаз є ферменти, які розкладають перекиси з утворенням кисню, що надалі стає акцептором атомів водню. До групи ферментів-пероксидаз належить, зокрема, каталаза.

Біологічна роль каталази полягає у знешкодженні пероксиду водню, який утворюється у процесі окисно-відновних реакцій в організмі. Вона розщеплює пероксид водню з утворенням молекулярного кисню та води:



Прояв дії цього ферменту добре простежується при промиванні порізів або ран пероксидом водню, коли відбувається ніби «закипання». Це є наслідком виділення O_2 в результаті розкладання пероксиду водню каталазою крові. Цей фермент міститься у всіх тканинах організму, але найактивніший він в еритроцитах і печінці. Активність каталази виражають каталазним числом і показником каталази. Каталазним числом називають кількість міліграмів пероксиду водню, яка розкладається каталазою, в 1 мкл крові за 30 хв. У нормі каталазне число дорівнює 10-15. Показником каталази називають дріб, у якому чисельником є каталазне число, а знаменником – число мільйонів еритроцитів в 1 мкл дослідженої крові.

Принцип методу. Активність каталази крові визначають за кількістю розкладеного пероксиду водню за одиницю часу. Кількість пероксиду водню визначається методом титрування згідно з реакцією:



Різниця кількості KMnO_4 , використана на титрування до і після дії каталази, характеризує активність ферменту. Об'єктивнішою одиницею є показник каталази, а не каталазне число, оскільки фермент наявний майже виключно в еритроцитах.

Реактиви: кров, 1% розчин пероксиду водню, 10% розчин сірчаної кислоти, 0,1н розчин перманганату калію.

Прилади і матеріали: колбочки або склянки на 50 мл, мірна колба ємністю 100 мл, мікропіпетки, піпетки, мікробюретки.

Хід роботи

Розведення крові у 1000 раз: у мірну колбу ємністю 100 мл наливають 10 мл дистильованої води і додають 0,1 мл крові. Перемішують, доливають дистильованою водою до мітки (1 мл гемолізату містить 1 мкл крові).

У дві колбочки наливають по 1 мл розведеної крові, додають по 7 мл дистильованої води і по 2 мл 1% пероксиду водню H_2O_2 . У контрольну пробу (1-ша колбочка) відразу наливають 5 мл 10% розчину сірчаної кислоти H_2SO_4 (в кислому середовищі дія каталази припиняється). Колбочки залишають при кімнатній температурі на 30 хв, періодично перемішуючи їх уміст.

У 2-гу колбочку (дослідна проба) доливають 5 мл 10% розчину сірчаної кислоти H_2SO_4 . Уміст кожної колбочки титрують 0,1 н розчином KMnO_4 до рожевого забарвлення, яке не зникає впродовж хвилини. Розраховують каталазне число за формулою:

$$\text{КЧ} = (A-B)1,7$$

A – кількість 0,1н KMnO_4 , яка затрачена на титрування контрольної проби;

B – кількість 0,1н KMnO_4 , затраченої на титрування дослідної проби.

Примітка: Грам-еквівалент пероксиду водню дорівнює 17 г

Отже, в 1 мл 0,1 н розчину міститься 1,7 мг H_2O_2 , оскільки 1 мл 0,1н KMnO_4 , еквівалентний 1мл 0,1 н H_2O_2 , то перемноживши 1,7 мг на різницю між кількістю KMnO_4 затраченого на титрування контрольної та дослідної проб, отримують кількість міліграмів H_2O_2 , яка розщеплюється 1 мкл крові, тобто безпосередньо каталазне число.

Клініко-діагностичне значення.

Активність каталази знижується при анемії, туберкульозі, ракових захворюваннях. Підвищується – при токсичному гепатиті, дії іонізуючого випромінювання, солей важких металів.

Контрольні питання

1. Що таке ферменти, їх хімічна природа, класифікація?
2. Роль пероксиду в організмі.
3. Біологічна роль каталази.
4. Принцип методу визначення каталази.
5. Клініко-діагностичне значення визначення каталази.
6. Властивості ферментів.
7. Механізм дії ферментативного каталізу.
8. Що таке каталазне число?

Ситуаційні завдання

1. Каталазне число у досліджуваного – 7. Що може бути причиною зниження активності каталази?
2. Каталазне число у досліджуваного – 21. За яких умов підвищується активність каталази?
3. У хворого гепатит токсичної етіології. Яке каталазне число слід очікувати?
4. У пацієнта – туберкульоз. Які зміни каталазного числа слід очікувати?