

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

КАФЕДРА КЛІНІЧНОЇ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ

**Практикум
з біохімії патологічних процесів**

**Біохімічні аспекти розвитку та діагностики
патологічних процесів в органах та тканинах організму
людини. Модуль 1.**

**ЗАПОРІЖЖЯ
2016**

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

КАФЕДРА КЛІНІЧНОЇ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ

Практикум з біохімії патологічних процесів

*для самостійної аудиторної та позааудиторної підготовки до
практичних занять і ліцензійного іспиту «Крок-2»*

студента-магістра _____
_____ групи I курсу II медичного факультету
зі спеціальності: 8.1201007 «Лабораторна діагностика»

Модуль 1. «Біохімічні аспекти розвитку та діагностики патологічних процесів в органах та тканинах організму людини»

ЗАПОРІЖЖЯ
2016

Практикум з клінічної біохімії для студентів-магістрів 5 курсу II медичного факультету спеціальності «Лабораторна діагностика» склали:

- © Павлов С.В. – д.біол.н., доцент
- © Горбачова С.В. – к.біол.н., доцент
- © Євсєєва Л.В., к.фарм.н. асистент
- © Біленький С.А. – к.мед.н., доцент
- © Левченко К.В асистент
- © Нікітченко Ю.В. викладач

Під загальною редакцією Павлова С.В.

Практикум містить всі матеріали, необхідні для самостійної позааудиторної підготовки студентів-магістрів спеціальності 6.120102 «Лабораторна діагностика» до практичних занять з біохімії патологічних процесів, для роботи під час практичних занять та для підготовки до залікового заняття. Для кожного практичного заняття визначені цілі заняття з теми, що вивчається. До кожного заняття запропоновано перелік теоретичних питань, які доцільно розглянути в процесі підготовки до заняття. Протоколи лабораторних робіт усіх занять містять визначення принципів методів, детальний опис ходу виконання цих лабораторних робіт та клініко-діагностичне значення дослідження біохімічних показників, які визначаються. Запропонований практикум включає тематичний план лекцій та лабораторно-практичних занять, завдання для самостійної роботи студентів, список основної та додаткової літератури.

Додатковою перевагою даного практикуму є те, що він містить тестові завдання з теоретичного матеріалу кожного заняття у відповідності з навчальною програмою, що дозволяє студентам після роботи з підручниками в процесі підготовки до заняття самостійно перевірити рівень своїх знань

В практикумі також наведені лабораторні роботи, які знайшли застосування в клінічній практиці, а також клініко-діагностичне значення біохімічних показників в нормі та при патології. Тестовий блок містить тестові завдання для перевірки засвоєння знань з відповідної теми модулю 1.

Рецензенти:

Професор кафедри біохімії д.фар.н., проф. Романенко М.І.

Завідувач кафедри аналітичної хімії д.фарм.н., проф. Васюк С.О.

Зміст:

1. Тематичний план лекцій	5
2. План лабораторно-практичних занять	6
3. Заняття № 1	7
4. Заняття № 2	16
5. Заняття № 3	24
6. Заняття № 4	30
7. Заняття № 5	38
8. Заняття № 6	44
9. Заняття № 7	51
10.Заняття № 8	56
11.Заняття № 9	62
12. Заняття № 10	67
13. Заняття № 11	79
14. Заняття № 12	81
15. Заняття № 13	93
16.Заняття № 14	101
17. Література	105

ТЕМАТИЧНИЙ ПЛАН ЛЕКЦІЙ

№ п/п	Тема	Кількість годин
1	Біохімічні констеляції і диференційна діагностика захворювань серцевого м'язу	2
2	Біохімічні фактори розвитку патохімічних змін судин при атеросклерозі, гіпертензії та інших формах судинних уражень	2
3	Оцінювання метаболічних процесів у разі порушення зовнішньо секреторної функції підшлункової залози	2
4	Клініко-лабораторні аспекти цукрового діабету. Біохімічні зміни при мікроангіопатіях, ретинопатії, нефропатії	2
5	Біохімічні маркери при порушення функції гіпофізу	2
6	Біохімічні маркери при порушення функції щитоподібної залози	2
7	Біохімічні маркери при порушення функції наднирників	2
8	Біохімічні дослідження при патології статевої системи	2
9	Біохімічні дослідження при пренатальній патології	2
10	Біохімічні дослідження електролітного гомеостазу	2
11	Біохімічні дослідження порушення кислотно-лужної рівноваги	2
12	Порушення метаболічних процесів при захворюваннях печінки та основні біохімічні синдроми патогенетичного процесу в клітинах печінки	2
13	Біохімічні основи порушення пігментного обміну. Диференційна діагностика різних видів жовтяниць за допомогою біохімічних досліджень	2
14	Біохімічні дослідження при онкопатології	2
15	Біохімічні дослідження показників для діагностики коагулопатій	2

ПЛАН ЛАБОРАТОРНО-ПРАКТИЧНИХ ЗАНЯТЬ

№ п/п	Тема	Кількість годин
1	Лабораторна діагностика захворювань серця	4
2	Лабораторна діагностика судинної патології	4
3	Біохімічні маркери патології підшлункової залози	8
4	Біохімічні маркери при порушенні функції гіпофізу	4
5	Біохімічні маркери при порушенні щитоподібної залози	4
6	Біохімічні маркери при порушенні функції наднирників	4
7	Біохімічні дослідження при патології статевої системи	4
8	Біохімічні дослідження у пренатальній діагностиці	4
9	Біохімічні дослідження електролітного гомеостазу	4
10	Біохімічні дослідження порушення кислотно-лужної рівноваги	4
11	Лабораторна діагностика захворювань печінки	4
12	Біохімічні дослідження при онкопатології	4
13	Біохімічні дослідження показників для діагностики коагулопатій	4
14	Залікове заняття	2

Заняття №1

ТЕМА: Лабораторна діагностика захворювань серця

МЕТА: На основі знань про біохімію та фізіологію серцевого м'яза сформуванати значення та методи якісного та кількісного визначення активності індикаторних ферментів та специфічних білків у ранній діагностиці інфаркту міокарда

ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ ПІД ЧАС ПІДГОТОВКИ ТА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

- 1) Особливості обміну речовин у серцевому м'язі при атеросклерозі коронарних артерій
- 2) Механізм ішемічного ураження міокарда
- 3) Біохімічна діагностика інфаркту міокарда:
 - Кінетика вивільнення тканинних ферментів під час гострого інфаркту міокарда (КФК, ЛДГ, АсАТ)
 - Діагностичне значення визначення специфічних протеїнів (тропоніни I та T, міоглобін)
- 4) Біохімічні фактори розвитку патохімічних змін при артеріальній гіпертензії
- 5) Корекція біохімічних змін під час лікування фармпрепаратами

Теми для рефератів:

- Використання РОСТ-аналізаторів у діагностиці інфаркту міокарда та особливості їх використання

ПРАКТИЧНІ РОБОТИ, ЯКІ ВИКОНУЮТЬСЯ НА ЗАНЯТТІ

ПРОТОКОЛ № 1

Дата

1. Визначення тропоніну I імунохроматографічним методом

Принцип методу: Тест працює за принципом імунохроматографічного аналізу з візуальним обліком результатів тестування. У місці внесення на

мембрану тесту зразок крові реагує з фарбованим кон'югатом. Тропонін I, який присутній у зразку, зв'язується з кон'югатом, утворюючи імунний комплекс. Останній під дією капілярної сили просовується вздовж мембрани і вступає в реакцію з іммобілізованими антитілами до тропоніну I, які були заздалегідь нанесені на тестову ділянку мембрани, в результаті чого утворюється червона лінія. Наявність червоної лінії на тестовій ділянці вказує на позитивний результат, в той час, як відсутність її вказує на негативний результат тестування. Червона лінія, яка буде з'являтися на контрольній ділянці, є процедурним індикатором роботи тесту, тим самим вказуючи, що достатня кількість зразку була використана і заповнення капілярів мембрани відбулося.

Чутливість та специфічність методу становлять 99,9%. Поріг чутливості становить 0,5 нг/мл

Обладнання і реagenти:

- 1) Сироватка крові, цільна кров
- 2) Секундомір
- 3) Діагностична касета

Проведення аналізу

Сироватка або плазма крові

1. Довести тест-касету до кімнатної температури
2. Відкрити запаяний пакет, дістати тест-касету та піпетку
3. Тримаючи піпетку вертикально, внести 2 краплі сироватки або плазми в лунку (S) на касеті та почати відлік часу
4. Облік результатів тестування проводять через 10 хвилин після внесення зразка в лунку.

Цільна венозна або капілярна кров

1. Довести тест-касету до кімнатної температури
2. Відкрити запаяний пакет, дістати тест-касету та піпетку
3. Тримаючи піпетку вертикально, внести 3 краплі крові в лунку (S) на касеті, потім додати 1 краплю буферу та почати відлік часу
4. Облік результатів тестування проводять через 10 хвилин після внесення зразка в лунку.

Не підлягає обліку результат тестування по завершенні 20 хвилин.



Облік результату

Позитивним вважається результат при появі двох чітких ліній червоного кольору. Одна лінія повинна з'явитися на контрольній ділянці (С), друга лінія – на тестовій ділянці (Т) тесту. Інтенсивність червоної лінії на тестовій ділянці (Т) може змінюватись в залежності від концентрації тропоніну І у зразку, що досліджується. Поява червоної лінії будь-якої інтенсивності у ділянці Т повинна розглядатися як позитивний результат тестування.

Негативним вважається результат при появі однієї чіткої червоної лінії на контрольній ділянці (С) тесту. Лінія червоного або рожевого кольору на тестовій ділянці Т відсутня.

Недійсним вважається результат при відсутності лінії червоного кольору на контрольній ділянці С. Причиною недейсного результату тестування може бути недостатня кількість зразку, що досліджується, недотримання процедури тестування, недотримання термінів придатності та умов зберігання швидких тестів. При отриманні недейсного результату тестування необхідно повторити дослідження з використанням іншої тест-касети.

Висновок:

2. Визначення тропоніну I імуноферментним методом

Принцип методу: Метод є твердофазним ферментно-зв'язаним імуносорбентним аналізом. В аналізі використовується 4 види антитіл. Тропонін I, що наявний у зразку, зв'язується з антитілами, що зафіксовані на дні лунок планшету, та з антитілами, які зв'язані з ензимним кон'югатом. В результаті інкубації утворюються імунні комплекси, кількість яких визначається додаванням тетраметилбензидину. Інтенсивність забарвлення, що розвивається, прямопропорційна кількості тропоніну I у досліджуваному зразку.

Лінійність методу: до 10000 нг/мл

Нормальні значення: сироватка, плазма – до 1,0 нг/мл

Обладнання і реагенти:

- 1) Спектрофотометр вертикального сканування (ридер) з довжиною хвилі 450 нм
- 2) Шейкер-термостат
- 3) Автоматичні піпетки на 0,1 і 5 мл
- 4) Сироватка крові
- 5) Дистильована вода
- 6) Набір реагентів для визначення вмісту тропоніну I імуноферментним методом

Проведення аналізу

1. Всі реагенти перед проведенням аналізу повинні бути доведені до кімнатної температури.
2. Внести по 0,1 мл калібрувальних та досліджуваних зразків у відповідні, відібрані для аналізу лунки
3. Додати у всі лунки по 0,1 мл кон'югату
4. Інкубувати стрип протягом 60 хвилин при кімнатній температурі
5. Після закінчення інкубації видалити вміст лунок, промити їх дистильованою водою 5 разів
6. Внести у всі лунки по 0,1 мл розчину ТМБ
7. Інкубувати при кімнатній температурі 20 хв у темному місці
8. Додати у всі лунки по 0,1 мл розчину соляної кислоти (стоп-реагент)
9. Виміряти оптичну щільність у кожній лунці на ридері при довжині хвилі 450 нм

Розрахунок

Визначення вмісту тропоніну I у кожній з дослідних проб проводиться за калібрувальним графіком з використанням програми імуноферментного ридеру

3. Визначення активності МВ-фракції креатинфосфокінази кінетичним методом

Принцип методу: Креатинфосфокіназа (КФК) каталізує перенесення залишку фосфорної кислоти з фосфокреатину на АДФ з утворенням АТФ, який вступає в реакцію з глюкозою з утворенням глюкозо-6-фосфату. Додавання НАДФ до реакційної суміші призводить до утворення 6-фосфоглюконату та відновленню НАДФ до НАДФН. Швидкість утворення НАДФН пропорційна активності КФК у досліджуваному зразку. У реакційну суміш введені специфічні антитіла проти М-субодиниці КФК, які повністю інгібують її активність. Таким чином, антитіла блокують активність КФК-ММ ізоферменту та половину активності КФК-МВ. Вказаним методом визначається лише половина активності МВ фракції КФК.

Лінійність методу: 10 – 160 Од/л

Нормальні значення: сироватка, плазма – до 25 Од/л (t^0 реакції 37 $^{\circ}$ С)
до 16 Од/л (t^0 реакції 30 $^{\circ}$ С)
до 10 Од/л (t^0 реакції 25 $^{\circ}$ С)

Активність ферменту стабільна протягом 8 годин при температурі +2 - +8 $^{\circ}$ С, за умови, що сироватка чи плазма відібрані не пізніше 30 хвилин після забору крові.

Обладнання і реагенти:

- 1) Сироватка крові
- 2) Секундомір
- 3) Скляні або автоматичні піпетки об'ємом 0,1 та 2,0 мл
- 4) Спектрофотометр (фотоелектроколориметр) з довжиною хвилі 340 нм та довжиною оптичного шляху 5 мм
- 5) Набір реагентів для визначення активності МВ-фракції КФК кінетичним імунологічним методом

Приготування робочих розчинів

Приготування робочого реагенту. У флакон з реагентом №2 внести 10 мл реагенту №1. для отримання оптимальних результатів рекомендується витримати робочий реагент після повного розчинення ліофілізату при кімнатній температурі 10 хвилин. Робочий реагент стабільний 5 днів при температурі від плюс 2 $^{\circ}$ С до плюс 8 $^{\circ}$ С у темному місці.

Проведення аналізу

Аналіз проводиться згідно таблиці 1.

Таблиця 1

Відміряти у пробірку, мл:	Дослідна проба
Робочий реагент	2,0
Досліджуваний зразок	0,08

Ретельно перемішати вміст пробірок, витримати 5 хвилин при вибраній температурі, визначити оптичну щільність інкубаційної суміші через 1, 2, 3, 4 і 5 хвилин проти дистильованої води. Обчислити швидкість зміни оптичної щільності реакційного розчину за 1 хвилину – $\Delta E/\text{хв}$.

Розрахунок

Для одержання активності ферменту необхідно помножити $\Delta E/\text{хв}$ на коефіцієнт:

$$\begin{aligned} & \text{в Од/л} - 8254 \\ & \text{в нмоль/(с*л)} - (\text{Од/л}) * 16,67 \end{aligned}$$

Заповнити таблицю

№ п/п	E	ΔE	Середнє ΔE	Абсолютне значення	
				Од/л	нмоль/(с*л)
E ₁					
E ₂					
E ₃					
E ₄					
E ₅					
E ₆					

Висновок:

4. Визначення активності лактатдегідрогенази ЛДГ-1 у сироватці крові кінетичним методом

Принцип методу: УФ-метод, що базується на перетворенні 2-оксибутирату в 2-гідроксибутират з одночасним окислюванням НАДН. Швидкість зменшення абсорбції при 340 нм, зв'язана з окислюванням НАДН, прямо пропорційна активності ЛДГ-1 (α -гідроксибутиратдегідрогенази) у дослідній пробі.

Лінійність методу: 0 – 1200 Мод/л

Нормальні значення: 72 – 182 Мод/л

Активність ферменту стабільна протягом 8 годин при температурі +2 - +8° С, за умови, що сироватка чи плазма відібрані не пізніше 30 хвилин після забору крові.

Обладнання і реagenти:

- 1) Спектрофотометр (фотоелектроколориметр) з довжиною хвилі 340 нм та довжиною оптичного шляху 10 мм
- 2) Автоматичні або скляні піпетки на 0,1 і 5 мл
- 3) Сироватка крові
- 4) Буферний розчин ЛДГ-1
- 5) Стабілізуючий розчин
- 6) Субстрат НАДН

Приготування робочих розчинів

Розчин субстрату P2. Вміст мікропробірки з НАДН перенести у флакон із стабілізуючим розчином і розчинити. Розчин стійкий не менше 1 місяця за умови збереження у темному місці при температурі від плюс 2⁰С до плюс 8⁰С

Монореагент. Змішати 4 частини P3 із 1 частиною P2. Стабільність монореактиву 3 тижні при температурі від плюс 2⁰С до плюс 8⁰С у темному місці.

Проведення аналізу

Аналіз проводиться згідно таблиці 1.

Таблиця 1

Відміряти у пробірку, мл:	Дослідна проба
Монореагент	5,0
Сироватка	0,1

Ретельно перемішати вміст пробірок, визначити оптичну щільність інкубаційної суміші через 1, 2 і 3 хвилини проти дистильованої води. Обчислити швидкість зміни оптичної щільності реакційного розчину за 1 хвилину – $\Delta E/\text{хв}$.

Розрахунок

Для одержання активності ферменту необхідно помножити $\Delta E/\text{хв}$. на коефіцієнт:

- в Од/л – 8095
- в мккат/л – 134,92

Заповнити таблицю

№ п/п	E	ΔE	Середнє ΔE	Абсолютне значення	
				Од/л	мккат/л
E ₁					
E ₂					
E ₃					
E ₄					

Висновок:

МАТЕРІАЛИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. Гострий початок захворювання. Біль в нижній третині груднини іррадіює по всьому животі, у шию, кінцівки. На ЕКГ патологічних відхилень немає. Лабораторні дослідження: лейкоформула і ШОЕ в нормі. Активність КФК-МВ 28 Од/л, тропонін I 3,3 нг/мл. Діагноз:
 - A. Стенокардія
 - B. Інфекційний гепатит
 - C. Гострий панкреатит
 - D. Інфаркт міокарда
 - E. Загострення хронічного гепатиту
2. На яку добу наступає нормалізація ЛДГ у сироватці крові хворих при сприятливому протіканні інфаркту міокарда?
 - A. Через 27 діб
 - B. Через 10 - 15 діб
 - C. Через 8 - 10 діб
 - D. Через 18 днів
 - E. Через 3 – 5 днів
3. Про що свідчить значно підвищена активність ЛДГ у сироватці крові хворих інфарктом міокарда протягом 20 - 27 діб?
 - A. Про глибокі зміни в серцевому м'язі
 - B. Про наявність великого, нерідко трансмурального інфаркту міокарда
 - C. Про уповільнення процесів репарації і можливого несприятливого прогнозу захворювання
 - D. Про «повзучий» інфаркт
 - E. Всі відповіді правильні
4. Підберіть правильну відповідь динаміки змін активності ферментів при стенокардії
 - A. КК, АсАТ - підвищується активність
 - B. ЛДГ, альдолаза - підвищується активність
 - C. АсАТ, АлАТ - знижується активність
 - D. КК, АсАТ – знижується активність
 - E. Активність перелічених вище ферментів у межах норми
5. Який лабораторний показник є найбільш достовірним для діагностики інфаркту міокарда

- A. АсАТ
 - B. КФК
 - C. Тропонін I або T
 - D. Міоглобін
 - E. АЛАТ
6. Який лабораторний показник є маркером серцевої недостатності?
- A. Тропонін I
 - B. Тропонін C
 - C. Предсердний натрійуретичний пептид - ANP
 - D. Попередник мозкового натрійуретичного пептиду - pro-BNP
 - E. Мозковий натрійуретичний пептид - BNP
7. Які зміни енергетичного обміну характерні для гіпоксії?
- A. Накопичення великої кількості молекул АТФ
 - B. Інактивація гліколізу та прискорення β -окислення жирних кислот
 - C. Зменшення кількості катехоламінів
 - D. Прискорення регенерації НАД
 - E. Всі відповіді правильні
8. Які особливості молекули міоглобіну обмежують його діагностичну значимість при діагностиці інфаркту міокарда?
- A. Низька специфічність вказаного показника
 - B. Відсутність достовірних лабораторних методів його визначення
 - C. Швидке виведення молекули міоглобіну нирками внаслідок її малої молекулярної маси
 - D. Пізнє підвищення концентрації міоглобіну після больового приступу
 - E. Всі відповіді правильні
9. Показаннями для визначення тропоніну T у сироватці крові є:
- A. Гострий інфаркт міокарду
 - B. Підгострий інфаркт міокарду
 - C. Діагностика мікроінфаркту
 - D. Моніторинг результатів тромболітичної терапії
 - E. Всі відповіді правильні
10. До незворотніх біохімічних змін при ішемії міокарду відносять:
- A. Ушкодження мембран мітохондрій та саркоплазматичного ретикулула
 - B. Підвищення рівня кальцію у клітині
 - C. Активація протеаз
 - D. Роз'єднання процесів окислення та фосфорилування
 - E. Всі відповіді правильні

5. ЛІТЕРАТУРА (див. на стор. 104)

Заняття №2

ТЕМА: Лабораторна діагностика судинної патології

МЕТА: Ознайомитися зі значенням вивчення ліпідного обміну та роллю його порушень у патогенезі розвитку атеросклерозу. Визначити біохімічні фактори розвитку атеросклерозу судин

ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ ПІД ЧАС ПІДГОТОВКИ ТА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

- 1) Будова і принципи класифікації ліпопротеїдів плазми.
- 2) Ліпід-транспортні білки – аполіпопротеїди, їх класифікація та функції
- 3) Модифіковані форми ліпопротеїдів: глікозильовані, пероксидно-модифіковані, аутоімунні комплекси. Їхня роль у механізмах розвитку атеросклерозу
- 4) Дисліпопротеїнемії та їх класифікація
- 5) Принципи лабораторної діагностики дисліпопротеїнемій
- 6) Біохімічні основи порушення обміну ліпідів при атеросклерозі
- 7) Апопротеїни (апо-А, апо-В): клініко-діагностичне значення та методи визначення
- 8) Роль оксиду азоту у розвитку патологічних процесів у серцево-судинній системі
- 9) Біохімічні ефекти гомоцистеїну

ПРАКТИЧНІ РОБОТИ, ЯКІ ВИКОНУЮТЬСЯ НА ЗАНЯТТІ

ПРОТОКОЛ № 2

Дата

1. Визначення холестерину загального ферментативним методом

Принцип методу: Холестерин сироватки крові під дією холестерин-оксидази окислюється киснем повітря до холестен-3-ону та перекису водню. Останній під дією пероксидази утворює з фенолом та 4-аміноантипірином хінонімін рожево-червоного кольору. Інтенсивність забарвлення розчину прямо пропорційна концентрації холестерину у крові.

Лінійність методу: 0,05 – 19,4 ммоль/л

Нормальні значення: 3,88 – 6,72 ммоль/л

Концентрація холестерину стабільна протягом 24 годин при температурі +2 - +8⁰ С, за умови, що сироватка чи плазма відібрані не пізніше 30 хвилин після забору крові.

Обладнання і реagenти:

- 1) Спектрофотометр (фотоелектроколориметр) з довжиною хвилі 540 нм та довжиною оптичного шляху 10 або 5 мм
- 2) Автоматичні або скляні піпетки на 0,02, 0,2 і 2 мл
- 3) Сироватка крові
- 4) Фізіологічний розчин
- 5) Реактив 1 (розчин ферменту)
- 6) Стандартний розчин холестерину

Проведення аналізу

Аналіз проводиться згідно таблиці 1.

Таблиця 1

Відміряти у пробірку:	Дослідна проба	Калібрувальна проба	Холоста проба
Досліджувананий матеріал	0,02 мл	--	--
Стандартний розчин	--	0,02 мл	--
Фіз. розчин	--	--	0,02 мл
Реактив 1	2,0 мл	2,0 мл	2,0 мл

Ретельно перемішати вміст пробірок та інкубувати при температурі 25⁰С протягом 20 хвилин або 10 хвилин при температурі 37⁰С. Виміряти оптичну щільність дослідної (E_{дос}) і стандартної (E_{каліб}) проб проти холостої проби при довжині хвилі 540 нм.

Забарвлення розчину стабільне протягом 60 хвилин.

Розрахунок

Вміст холестерину у досліджуваному матеріалі розраховують за стандартом по формулі:

$$C_{\text{дос}} \text{ (ммоль/л)} = \frac{E_{\text{дос}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}}$$

де C_{дос} – концентрація холестерину у досліджуваній пробі, ммоль/л;

E_{дос} – оптична щільність дослідної проби;

E_{ст} – оптична щільність стандартної проби;

C_{ст} – концентрація холестерину в стандартному розчині

При вмісті холестерину в дослідній пробі понад 19,4 ммоль/л (поза зоною лінійності методу), аналізовану рідину слід розвести фізіологічним

розчином і повторити вимірювання, а отриманий результат розрахунку помножити на коефіцієнт розведення.

Заповнити таблицю

№ п/п	№ зразка	Оптична щільність	Абсолютне значення, ммоль/л

Висновок:

2. Визначення холестерину у ліпопротеїдах високої щільності прямим методом

Принцип методу: Антитіла до β -ліпопротеїдів, що містяться у реагенті 1, утворюють імунний комплекс з усіма ліпопротеїдами, окрім ЛПВЩ. Утворення імунних комплексів блокує участь зв'язаних ліпопротеїдів у реакції з реактивом 2. Холестериноксидаза та холестеринестераза з реагенту 2 окислюють тільки ЛПВЩ.

Лінійність методу: 0,05 – 19,4 ммоль/л

Нормальні значення: 3,88 – 6,72 ммоль/л

Концентрація холестерину стабільна протягом 24 годин при температурі $+2 - +8^{\circ}\text{C}$, за умови, що сироватка чи плазма відібрані не пізніше 30 хвилин після забору крові.

Обладнання і реагенти:

- 7) Спектрофотометр (фотоелектроколориметр) з довжиною хвилі 540 нм та довжиною оптичного шляху 10 або 5 мм
- 8) Автоматичні або скляні піпетки на 0,02, 0,2 і 2 мл
- 9) Сироватка крові
- 10) Фізіологічний розчин
- 11) Реактив 1 (розчин ферменту)
- 12) Стандартний розчин холестерину, ммоль/л.

Проведення аналізу

Аналіз проводиться згідно таблиці 1.

Таблиця 1

Відміряти у пробірці:	Дослідна проба	Калібрувальна проба	Холоста проба
Досліджуваваний матеріал	0,02 мл	--	--
Стандартний розчин	--	0,02 мл	--
Фіз. розчин	--	--	0,02 мл
Реактив 1	2,0 мл	2,0 мл	2,0 мл

Ретельно перемішати вміст пробірок та інкубувати при температурі 25⁰С протягом 20 хвилин або 10 хвилин при температурі 37⁰С. Виміряти оптичну щільність дослідної (E_{дос}) і стандартної (E_{каліб}) проб проти холостої проби при довжині хвилі 540 нм.

Забарвлення розчину стабільне протягом 60 хвилин.

Розрахунок

Вміст холестерину у досліджуваному матеріалі розраховують за стандартом по формулі:

$$C_{\text{дос}} \text{ (ммоль/л)} = \frac{E_{\text{дос}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}}$$

де C_{дос} – концентрація холестерину у досліджуваній пробі, ммоль/л;

E_{дос} – оптична щільність дослідної проби;

E_{ст} – оптична щільність стандартної проби;

C_{ст} – концентрація холестерину в стандартному розчині

При вмісті холестерину в дослідній пробі понад 19,4 ммоль/л (поза зоною лінійності методу), аналізовану рідину слід розвести фізіологічним розчином і повторити вимірювання, а отриманий результат розрахунку помножити на коефіцієнт розведення.

Заповнити таблицю

№ п/п	№ зразка	Оптична щільність	Абсолютне значення, ммоль/л

Висновок:

3. Визначення холестерину у ліпопротеїдах низької щільності турбідиметричним методом

Принцип методу: В присутності хлориду кальцію та гепарину порушується колоїдна стійкість білків сироватки крові, у зв'язку з чим в осад випадають тільки β -ліпопротеїни. При цьому гепарин утворює з β -ліпопротеїнами комплекс, який під дією хлористого кальцію випадає в осад. За ступенем каламутності визначають вміст β -ліпопротеїнів у сироватці крові.

Нормальні значення: 0,35 – 0,55 оптичних одиниць або 35 – 55 умовних одиниць.

Концентрація β -ліпопротеїнів стабільна протягом 24 годин при температурі $+2 - +8^{\circ}\text{C}$.

Обладнання і реagenти:

- 1) Спектрофотометр (фотоелектроколориметр) з довжиною хвилі 720 нм та довжиною оптичного шляху 5 мм
- 2) Автоматичні або скляні піпетки на 0,04, 0,2 і 2 мл
- 3) Сироватка крові
- 4) Фізіологічний розчин
- 5) 0,28% розчин хлориду кальцію. Розчин готують шляхом додавання до 1 мл 10% ампульного розчину хлориду кальцію 17 мл дистильованої води.
- 6) Розчин гепарину активністю 1000 одиниць в 1 мл

Проведення аналізу

У праву та ліву кювети фотоколориметра вносять по 2 мл 0,28% розчину хлориду кальцію та виставляють нульову точку при червоному світофільтрі. Потім у праву кювету приливають 0,2 мл сироватки та після перемішування скляною паличкою вимірюють оптичну щільність, яка звичайно складає 0,01; 0,02; 0,03. Потім в цю ж кювету додають 0,04 мл розчину гепарину, перемішують паличкою та засікають час секундоміром. Через 4 хвилини повторно вимірюють оптичну щільність вмісту кювети.

Розрахунок

Результат виражають в одиницях оптичної щільності: $E = E_2 - E_1$, або в умовних одиницях: $E = (E_2 - E_1)$, де E_1 – оптична щільність розчину перед додаванням розчину гепарину, E_2 – оптична щільність розчину через 4 хвилини після додавання розчину гепарину.

Клініко-діагностичне значення. Збільшення вмісту β -ліпопротеїнів – патологія, що найчастіше зустрічається при дослідженні ліпідограми. Вона супроводжує атеросклероз, інтрагепатальний застій жовчі, механічній жовтяниці, діабеті, гіпотиреозі, мононуклеозі, β_1 -плазмоцитомі. Зменшення β -ліпопротеїнової фракції відмічається при β_2 -плазмоцитомі.

Заповнити таблицю

№ п/п	№ зразка	Оптична щільність	Абсолютне значення, ммоль/л

Висновок:

4. Визначення вмісту аполіпопротеїну А у сироватці крові імунотурбідиметричним методом

Принцип методу: аполіпопротеїн А (АпоА) реагує з відповідними антитілами з формуванням імунних комплексів. В результаті утворюється мутна суспензія, оптична щільність якої вимірюють фотометрично. Величина оптичної щільності залежить від вмісту АпоА у досліджуваному зразку.

Лінійність методу: 0,05 – 3,0 г/л

Нормальні значення: чоловіки – 1,07 – 1,77 г/л

жінки – 1,07 – 2,50 г/л

АпоА стабільний протягом 48 годин при температурі +2 - +8⁰ С, за умови, що сироватка чи плазма відібрані не пізніше 30 хвилин після забору крові.

Обладнання і реагенти:

- 1) Спектрофотометр (фотоелектроколориметр) з довжиною хвилі 340 нм та довжиною оптичного шляху 10 мм
- 2) Автоматичні або скляні піпетки на 0,02; 0,2 і 2 мл
- 3) Сироватка крові
- 4) Набір реагентів для визначення АпоА імунотурбідиметричним методом
- 5) Калібрувальний графік для визначення АпоА

Проведення аналізу

Перед проведенням аналізу необхідно розвести зразок у 10 разів фізіологічним розчином.

Аналіз проводиться згідно таблиці 1.

Таблиця 1

Відміряти у пробірку, мл:	Дослідна проба
Реагент №1	1,8
Сироватка	0,02

Ретельно перемішати вміст пробірок, визначити оптичну щільність інкубаційної суміші – E_1 . Внести у пробірки по 0,16 мл реагенту №2, ретельно перемішати, витримати 5 хвилин та виміряти оптичну щільність E_2 .

Розрахунок

Розрахувати зміну оптичної щільності реакційного розчину – $\Delta E = E_2 - E_1$ та за калібрувальним графіком визначити вміст АпоА у зразку

Заповнити таблицю

№ п/п	E_1	E_2	ΔE	Абсолютне значення, г/л
1				
2				
3				
4				

Висновок:

МАТЕРІАЛИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. Плазма каламутна, прошарок ХМ при стоянні плазми не утворився. Загальний ХС 4,9 ммоль/л, ТГ 3,7 ммоль. При електрофорезі смуга пре-бета-ЛП нормальної інтенсивності. Ослаблена фракція альфа-ліпопротеїнів. Тип дисліпопротеїнемії:
 - А. II типу
 - В. I типу
 - С. IV типу
 - Д. III типу
 - Е. V типу
2. Які показники ліпідного обміну необхідно визначити для розрахунку вмісту ХС-ЛПНГ по формулі?
 - А. Загальні ліпіди
 - В. Загальний холестерин, ТГ
 - С. Фосфоліпіди
 - Д. Загальний холестерин, ТГ, ХС-ЛПВГ
 - Е. Тригліцериди та фосфоліпіди
3. Якими видами клітин утворюються і секретуються плазменні ліпопротеїди?
 - А. Паренхіматозними клітинами печінки
 - В. Епітеліальними клітинами тонкого кишківника

- С. Паренхіматозними клітинами печінки та епітеліальними клітинами тонкого кишківника
- Д. Бета-клітинами підшлункової залози
- Е. Всі відповіді правильні
4. Вміст якого класу ліпопротеїдів в крові залежить від функції статевих гормонів, естрогенів
- А. ЛПДНГ
- В. ЛПНГ
- С. ЛПВГ
- Д. ЛППГ
- Е. Всі відповіді правильні
5. Який тип дисліпопротеїдемії варто встановити, якщо плазма злегка каламутна, вміст ліпопротеїдів збільшений за рахунок бета- і пребета- ЛП, збільшена концентрація ХС, ТГ?
- А. II б
- В. III
- С. IV
- Д. I
- Е. V
6. Попередником оксиду азоту в організмі людини є:
- А. Цитрулін
- В. Аргінін
- С. Глутатіон
- Д. Глутамат
- Е. Всі відповіді правильні
7. Молекулярні ефекти оксиду азоту опосередковуються через:
- А. цАМФ
- В. цГМФ
- С. Кальмодулін
- Д. Інозитолфосфат
- Е. Фосфорилази
8. Продуктом метаболізму якої амінокислоти є гомоцистеїн?
- А. Цистеїну
- В. Гліцину
- С. Триптофану
- Д. Метионіну
- Е. Лізину
9. До причин гіпергомоцистеїнемії відносять:
- А. Порушення обміну вітамінів групи В
- В. Захворювання нирок
- С. Дефіцит тиреоїдних гормонів
- Д. Генетичні дефекти
- Е. Всі відповіді правильні
10. З якою метою у лабораторній практиці визначають рівень гомоцистеїну?

- A. Для виявлення спадкових порушень обміну амінокислот
- B. Як незалежний фактор ризику серцево-судинних захворювань
- C. З метою діагностики захворювань нирок
- D. При авітамінозах вітаміну B₁₂
- E. Всі відповіді правильні

5. ЛІТЕРАТУРА (див. на стор. 105)

Заняття №3

ТЕМА: Біохімічні маркери патології підшлункової залози

МЕТА: Визначити біохімічні показники, що використовуються для оцінки екзокринної функції підшлункової залози

ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ ПІД ЧАС ПІДГОТОВКИ ТА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

- 1) Патобіохімічні процеси у шлунку, лабораторна діагностика (гастрин, уреазний тест)
- 2) Зовнішньосекреторна функція підшлункової залози та її порушення
- 3) Регуляція секреції ферментів підшлункової залози
- 4) Методи визначення активності індикаторних ферментів (α -амілази, ліпази)
- 5) Методи оцінювання метаболічних процесів у разі порушення зовнішньосекреторної функції підшлункової залози
- 6) Наслідки недостатності ферментів підшлункової залози, синдром мальабсорбції

ПРАКТИЧНІ РОБОТИ, ЯКІ ВИКОНУЮТЬСЯ НА ЗАНЯТТІ

ПРОТОКОЛ № 3

Дата

1. Визначення активності α -амілази у сироватці крові та сечі методом

Каравея

Принцип методу: У присутності α -амілази крохмаль гідролізується до похідних, що не дають кольорової реакції з йодом. Зміна інтенсивності

фарбування йод-крохмального комплексу пропорційна активності ферменту в дослідній пробі.

Лінійність методу: 3,0 – 36,0 мг/сек*л

Нормальні значення: сироватка, плазма – 3,3 – 8,9 мг/сек*л (12–32 мг/год*мл)

Сеча – до 44 мг/сек*л (до 120 мг/год*мл)

Дуоденальний вміст – 1,7 – 4,4 г/сек*л (6 – 16 г/год*мл)

Активність ферменту стабільна протягом 5 годин при температурі +2 - +8° С, за умови, що сироватка чи плазма відібрані не пізніше 30 хвилин після забору крові.

Обладнання і реagenти:

- 1) Спектрофотометр (фотоелектроколориметр) з довжиною хвилі 640 нм та довжиною оптичного шляху 10 мм
- 2) Водяний термостат або автоматична водяна баня, які здатні підтримувати температуру (плюс 37 ±1)°С.
- 3) Автоматичні або скляні піпетки на 0,1 і 5 мл
- 4) Мірна колба місткістю 1000 мл
- 5) Сироватка крові
- 6) Субстратно-буферний розчин
- 7) Розчин йоду 0,1 н
- 8) Розчин інгібітору

Проведення аналізу

Аналіз проводиться згідно таблиці 1.

Таблиця 1

Відміряти у пробірку, мл:	Дослідна проба	Холоста проба	Контрольна проба
Субстратно-буферний розчин	1,0	1,0	1,0
Інкубувати 3 хв при +37°С			
Сироватка крові	0,02	-	-
Інкубувати 7,5 хв при +37°С			
Розчин йоду 0,1 н	1,0	1,0	-
Сироватка крові	-	0,02	-
Вода дистильована	8,0	8,0	9,0

Ретельно перемішати вміст пробірок та інкубувати при температурі 25°С протягом 5 хвилин. Виміряти оптичну щільність дослідної ($E_{\text{дос}}$) та калібрувальної проби ($E_{\text{кал}}$) проти холостої при довжині хвилі 640 – 670 нм. Забарвлення розчину стабільне протягом 30 хвилин.

Розрахунок

Розрахунок активності фермента в сироватці крові проводять за формулою

$$C_{\text{дос}} = \frac{E_{\text{к}} - E_{\text{д}}}{E_{\text{к}}} \times 160 \quad (\text{г/год}^* \text{л})$$

де $C_{\text{дос}}$ – активність амілази у дослідному зразку;

$E_{\text{д}}$ – оптична щільність дослідної проби;

$E_{\text{к}}$ – оптична щільність контрольної проби;

160 – фактор перерахування, г/год*л

Заповнити таблицю

№ п/п	№ зразка	Оптична щільність	Абсолютне значення,

Висновок:

2. Визначення активності панкреатичної ліпази у сироватці крові

Принцип методу: Під дією α -амілази синтетичний субстрат EPS гідролізується з утворенням безбарвних нітрофенілмальтоозидів. α -Глюкозидаза гідролізує нітрофенілмальтоозиди до глюкози та забарвленого п-нітрофенолу. Швидкість зростання концентрації п-нітрофенолу пропорційна активності ферменту. В реакційну суміш введені специфічні антитіла до α -амілази слини, що повністю блокують її активність. Швидкість зростання оптичної щільності пропорційна активності панкреатичного ізоферменту α -амілази.

Лінійність методу: 20 – 1000 Од/л

Нормальні значення: сироватка, плазма крові – 20 – 53 Од/л

Сеча 20 – 356 Од/л

Активність ферменту стабільна протягом 8 годин при температурі +2 - +8⁰ С, за умови, що сироватка чи плазма відібрані не пізніше 30 хвилин після забору крові.

Обладнання і реagenти:

- 1) Спектрофотометр (фотоелектроколориметр) з довжиною хвилі 405 нм та довжиною оптичного шляху 5 або 3 мм
- 2) Автоматичні або скляні піпетки на 0,1 і 5 мл
- 3) Сироватка крові
- 4) Набір реагентів для визначення активності панкреатичної α -амілази кінетичним імунологічним методом

Приготування робочих розчинів

Монореагент. Змішати 4 частини Р1 із 1 частиною Р2. Стабільність монореактиву 10 днів при температурі від плюс 2⁰С до плюс 8⁰С у темному місці.

Проведення аналізу

Аналіз проводиться згідно таблиці 1.

Таблиця 1

Відміряти у пробірку, мл:	Дослідна проба
Монореагент	3,0
Досліджуваний зразок	0,1

Ретельно перемішати вміст пробірок, витримати 2 хвилини при +37⁰ С. Визначити оптичну щільність інкубаційної суміші відразу та через 1, 2 і 3 хвилини проти дистильованої води. Обчислити швидкість зміни оптичної щільності реакційного розчину за 1 хвилину – ΔE /хв.

Розрахунок

Для одержання активності ферменту необхідно помножити ΔE /хв. на коефіцієнт F, значення якого вказане у інструкції до набору реагентів.

Заповнити таблицю

№ п/п	E	ΔE	Середнє ΔE	Абсолютне значення, Од/л
E ₁				
E ₂				
E ₃				
E ₄				

Висновок:

МАТЕРІАЛИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. Вплив яких факторів необхідно враховувати при визначенні активності альфа-амілази в крові і сечі
 - A. Характер харчування
 - B. Вживання алкоголю
 - C. Емоційні, стресові стани
 - D. Фармакологічні речовини (прийом лікарських препаратів)
 - E. Всі відповіді правильні
2. Як змінюється активність альфа-амілази в крові та у сечі хворих з нефротичним синдромом?
 - A. У крові активність альфа-амілази підвищена, у сечі - без змін
 - B. У крові активність альфа-амілази підвищена, у сечі - різко знижена
 - C. У крові активність альфа-амілази знижена, у сечі - не визначається
 - D. Активність альфа-амілази в крові і сечі підвищена
 - E. Немає правильної відповіді
3. При яких з перелічених нижче захворюваннях спостерігається зниження активності альфа-амілази в крові?
 - A. Гепатитах, цирозах і пухлинах печінки
 - B. Масивному некрозі, атрофії підшлункової залози
 - C. Цукровому діабеті, гіпотиреозах
 - D. Фіброзі підшлункової залози
 - E. Всі відповіді правильні
4. Для якого захворювання характерне значне збільшення активності ліпази?
 - A. Токсичний гепатит
 - B. Гострий гепатит, цироз печінки
 - C. Печінкова кома
 - D. Гострий панкреатит
 - E. Фіброзі підшлункової залози
5. Які фактори знижують активність амілази в крові?
 - A. Використання лимоннокислої плазми
 - B. Використання щавлевокислої плазми
 - C. Визначення активності альфа-амілази через добу і більш після узяття крові
 - D. Температура інкубаційного середовища нижче 37⁰C
 - E. Все перелічене
6. «Золотим стандартом» у лабораторній діагностиці порушень екзокринної функції підшлункової залози є:
 - A. Ліпаза
 - B. Панкреатична амілаза
 - C. Імунореактивний трипсин
 - D. Панкреатична еластаза
 - E. Плазменний інгібітор трипсину

7. З метою діагностики тяжкості патологічного процесу у підшлунковій залозі окрім індикаторних ферментів визначають:
- A. С-реактивний білок
 - B. Загальний аналіз крові
 - C. Копроцитограму
 - D. Інтерлейкін-6
 - E. Всі відповіді правильні
8. Назвіть найбільш чутливі методи визначення активності альфа-амілази
- A. Цукрофікуючі
 - B. Амілокластичні
 - C. Хроматографічні
 - D. Спектрофотометричні
 - E. Імунологічні
9. До функціональних проб при вивченні екзокринної функції підшлункової залози відносять:
- A. Глюкозотолерантний тест
 - B. Прозериновий тест
 - C. Тест на ухилення після введення секретину
 - D. Тест на ухилення після введення холецистокініну
 - E. Всі відповіді правильні, окрім А
10. У нормі амілазо-креатиніновий кліренс становить:
- A. 3 - 5%
 - B. 1,8 – 2,5%
 - C. 0,5 – 1,5%
 - D. 10 – 12%
 - E. 8 – 10%

5. ЛІТЕРАТУРА (див. на стор. 105)

Заняття №4

ТЕМА: Біохімічні маркери патології підшлункової залози

МЕТА: Визначити біохімічні показники, що використовуються для оцінки ендокринної функції підшлункової залози

ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ ПІД ЧАС ПІДГОТОВКИ ТА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

- 1) Порушення ендокринної функції підшлункової залози. Патогенез і основні клінічні ознаки цукрового діабету I та II типів

- 2) Фактори, що обумовлюють підтримку та порушення гомеостазу глюкози в організмі
- 3) Тести толерантності до вуглеводів, їхнє клінічне значення
- 4) Лабораторна діагностика цукрового діабету (інсулін, С-пептид, глікозований гемоглобін, фруктозамін, мікроальбумін)
- 5) Метаболічні ускладнення при цукровому діабеті
- 6) Віддалені ускладнення цукрового діабету

ПРАКТИЧНІ РОБОТИ, ЯКІ ВИКОНУЮТЬСЯ НА ЗАНЯТТІ

ПРОТОКОЛ № 4

Дата

1. . Визначення глюкози глюкозооксидазним методом

Принцип методу: Глюкоза у присутності глюкозооксидази окислюється киснем повітря до глюконової кислоти та перекису водню. Останній, у присутності пероксидази, вступає у реакцію з фенолом та 4-амінофеназоном з утворенням хіноніміну червоно-фіолетового кольору, кількість якого визначається фотометрично.

Лінійність методу: 0,05 – 27,7 ммоль/л

Нормальні значення: капілярна кров – 3,38 – 5,55 ммоль/л

сироватка, плазма – 4,22 – 6,11 ммоль/л

сеча – 0,0 – 1,11 ммоль/л

Концентрація глюкози стабільна протягом 24 годин при температурі +2 - +8⁰ С, за умови, що сироватка чи плазма відібрані не пізніше 30 хвилин після забору крові.

Обладнання і реагенти:

- 1) Спектрофотометр (фотоелектроколориметр) з довжиною хвилі 540 нм та довжиною оптичного шляху 10 або 5 мм
- 2) Автоматичні або скляні піпетки на 0,02, 0,2 і 2 мл
- 3) Колба об'ємом 500 мл
- 4) Сироватка крові, цільна кров або сеча
- 5) Фізіологічний розчин
- 6) Буферний розчин (рН 7,2 – 7,4)
- 7) Розчин ферменту (глюкозооксидаза, пероксидаза, 4-амінофеназон, стабілізатори)
- 8) Антикоагулянт – суха суміш натрію оксалату та натрію хлориду
- 9) Калібратор – калібрувальний розчин глюкози, 10,0 ммоль/л.

Приготування робочих розчинів

Розчин антикоагулянту. В колбу ємністю 500 мл перенести вміст пакету з антикоагулянтом, додати 400 мл дистильованої води, перемішати до повного розчинення кристалів солей. При необхідності розчин профільтрувати. Готовий розчин стабільний не менше місяця при температурі +2 - +8°С.

Буферний розчин та розчин ензиму готові до використання у випадку проведення аналізу з біреагентом. Для приготування монореагенту розчин буферу та ензиму змішують у співвідношенні 1:1. розчин стійкий при зберіганні при температурі +2 - +8°С.

Проведення аналізу

Сироватка або плазма крові, сеча. Аналіз проводиться згідно таблиці 1.

Таблиця 1

Відміряти у пробірку:	Варіант з використанням монореагенту		
	Дослідна проба	Калібрувальна проба	Холоста проба
Досліджуванний матеріал	0,02 мл	--	--
Калібратор	--	0,02 мл	--
Фіз. розчин	--	--	0,02 мл
Монореагент	2,0 мл	2,0 мл	2,0 мл
Варіант з використанням біреагенту			
Досліджуванний матеріал	0,02 мл	--	--
Калібратор	--	0,02 мл	--
Фіз. розчин	--	--	0,02 мл
Буферний розчин	1,0 мл	1,0 мл	1,0 мл
Розчин ферменту	1,0 мл	1,0 мл	1,0 мл

Цільна кров. Аналіз проводиться з використанням антикоагулянту.

Для отримання плазми 0,1 мл цільної капілярної крові змішують з 0,9 мл розчину антикоагулянту та центрифугують 10 хвилин при 2000 об/хв. Для осадження еритроцитів. Для дослідження використовують надосадкову рідину. Калібрувальний розчин глюкози розводять фізіологічним розчином у 10 разів (до 0,1 мл калібрувального розчину 10 ммоль/л додають 0,9 мл фізіологічного розчину).

Аналіз проводять згідно таблиці 2.

Таблиця 2

Відміряти у пробірку:	Варіант з використанням монореагенту		
	Дослідна проба	Калібрувальна проба	Холоста проба
Досліджуван-ний матеріал	0,2 мл	--	--
Калібратор	--	0,2 мл	--
Фіз. розчин	--	--	0,2 мл
Монореагент	2,0 мл	2,0 мл	2,0 мл
Варіант з використанням біреагенту			
Досліджуван-ний матеріал	0,2 мл	--	--
Калібратор	--	0,2 мл	--
Фіз. розчин	--	--	0,2 мл
Буферний розчин	1,0 мл	1,0 мл	1,0 мл
Розчин ферменту	1,0 мл	1,0 мл	1,0 мл

Ретельно перемішати вміст пробірок та інкубувати при температурі 25⁰С протягом 20 хвилин або 12 хвилин при температурі 37⁰С. Виміряти оптичну щільність дослідної (E_{дос}) і калібрувальної (E_{каліб}) проб проти холостої проби при довжині хвилі 540 нм.

Забарвлення розчину стабільне протягом 30 хвилин.

Розрахунок

Вміст глюкози у досліджуваному матеріалі розраховують за стандартом (калібратором) по формулі:

$$C_{\text{дос}} \text{ (ммоль/л)} = \frac{E_{\text{дос}}}{E_{\text{каліб}}} \times C_{\text{каліб}}$$

де C_{дос} – концентрація глюкози у досліджуваній пробі, ммоль/л;

E_{дос} – оптична щільність дослідної проби;

E_{каліб} – оптична щільність калібрувальної проби;

C_{каліб} – концентрація глюкози в калібраторі (10 ммоль/л)

При вмісті глюкози в пробі понад 27,7 ммоль/л (поза зоною лінійності методу), аналізовану рідину слід розвести у 5 разів фізіологічним розчином і повторити вимірювання, а отриманий результат розрахунку помножити на 5.

Заповнити таблицю

№ п/п	№ зразка	Оптична щільність	Абсолютне значення, ммоль/л

Висновок:

2. Визначення глікозованого гемоглобіну імунотурбідиметричним методом

Принцип методу: Метод прямого визначення % глікозованого гемоглобіну крові заснований на реакції взаємодії між антигеном та антитілом. Загальний гемоглобін та глікозований гемоглобін з'єднуються з латексними частинами реагенту 1. Додавання до розчину реагенту 2, що містить антитіла до глікозованого гемоглобіну, викликає утворення імунних комплексів та зміну оптичної щільності реакційної суміші. Збільшення оптичної щільності прямопропорційне концентрації глікозованого гемоглобіну у досліджуваному зразку.

Лінійність методу: до 15,1%

Нормальні значення: цільна венозна кров – 2,9 – 6,0%

Обладнання і реагенти:

- 1) Цільна венозна кров, стабілізована К₃ЕДТА
- 2) Спектрофотометр (фотоелектроколориметр) з довжиною хвилі 660 нм
- 3) Набір реагентів для визначення глікозованого гемоглобіну прямим імунотурбідиметричним методом
- 4) Автоматичні піпетки на 0,02, 0,3 і 1 мл

Проведення аналізу

Підготовка гемолізату. До 1 мл гемолізуючого розчину додати 20 мкл цільної крові, витримати 5 хвилин до повного гемолізу еритроцитів.

Підготовка реагенту №2. Реагент R2В розчинити у реагенті R2А. Ретельно перемішати. Стабільність розчину 30 днів при (+2 - +8)⁰С

Аналіз проводиться згідно таблиці 1.

Таблиця 1

Відміряти у пробірку, мл:	Дослідна проба	Калібрувальні проби
Реагент №1	0,9	0,9
Зразок	0,025	-
Калібрувальні проби	-	0,025
Витримати 5 хвилин при 37 ⁰ С		
Реактив №2	0,3	0,3

Ретельно перемішати вміст пробірок, витримати 5 хвилин при 37⁰С, визначити оптичну щільність інкубаційної суміші дослідних та калібрувальних проб відносно реагенту №1.

Розрахунок

Визначення % глікозованого гемоглобіну проводять за калібрувальним графіком.

Заповнити таблицю

№ п/п	№ зразка	Оптична щільність	Абсолютне значення

Висновок:

3. Визначення інсуліну імуноферментним методом

Принцип методу: в наборі використовується «сендвіч»-варіант твердофазного імуноферментного аналізу.

Лінійність методу: 0,0 – 100,0 мкОд/мл

Нормальні значення: 2,0 – 25,0 мкОд/мл

Концентрація інсуліну стабільна протягом 2 діб при температурі +2 - +8⁰ С, за умови, що сироватка чи плазма без слідів гемолізу.

Обладнання і реагенти:

- 1) Спектрофотометр вертикального сканування (ридер) з довжиною хвилі 450 нм
- 2) Автоматичні піпетки на 0,025, 0,05 і 1 мл
- 3) Сироватка крові

- 4) Дистильована вода
- 5) Калібрувальні проби
- 6) Концентрат буферу для промивання
- 7) Ензимний кон'югат
- 8) Ензимний комплекс
- 9) Розчин тетраметилбензидину (ТМБ)
- 10) Розчин соляної кислоти (стоп-реагент)

Проведення аналізу

1. Всі реагенти перед проведенням аналізу повинні бути доведені до кімнатної температури.
2. Внести по 0,025 мл калібрувальних та досліджуваних зразків у відповідні, відібрані для аналізу лунки
3. Додати у всі лунки по 0,025 мл ензимного кон'югату
4. Інкубувати стрип протягом 30 хвилин при кімнатній температурі
5. Приготувати буфер для промивання: 5 мл концентрату внести у мірну колбу на 100 мл, дистильованою водою довести до мітки
6. Після закінчення інкубації видалити вміст лунок, промити їх приготованим буферним розчином 5 разів
7. Внести у всі лунки по 0,05 мл ензимного комплексу
8. Інкубувати стрипи при кімнатній температурі 30 хв
9. Після закінчення інкубації видалити вміст лунок, промити їх приготованим буферним розчином 5 разів
10. Внести у всі лунки по 0,05 мл розчину ТМБ
11. Витримати 20 хв у темному місці для розвитку забарвлення
12. Додати у всі лунки по 0,05 мл розчину сірчаної кислоти (стоп-реагент)
13. Виміряти оптичну щільність у кожній лунці на ридері при довжині хвилі 450 нм

Розрахунок

Визначення вмісту інсуліну у кожній з дослідних проб проводиться за калібрувальним графіком з використанням програми імуноферментного ридеру

МАТЕРІАЛИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. Яка концентрація глюкози в крові через 2 години при проведенні ТТГ характерна для порушеної толерантності до глюкози?
 - A. 5,0 - 8,0 ммоль/л
 - B. 12,0 - 14,0 ммоль/л
 - C. 8,0 - 11,0 ммоль/л
 - D. 8,0 - 13,0 ммоль/л
 - E. 10,0 - 14,0 ммоль/л
2. При якому з перелічених захворювань відзначається помірна гіперглікемія?
 - A. Гострому панкреатиті

- В. Травма, пухлина мозку
 - С. Епілепсія
 - Д. Отруєнні ртуттю, ефіром, окислом вуглецю
 - Е. Всі відповіді правильні
3. При якому з перелічених захворювань відзначається підвищення концентрації глюкози в сечі (глюкозурія) при нормальному її вмісту в крові?
- А. Синдром Іценко-Кушинга
 - В. Нирковий діабет
 - С. Феохромоцитома
 - Д. Цироз печінки
 - Е. Всі відповіді правильні
4. При яких захворюваннях спостерігаються глікемічні криві зі значним підйомом і уповільненим поверненням до норми?
- А. Інфекційні захворювання (дизентерія, сепсис)
 - В. Гіперфункція передньої частини гіпофіза (акромегалія)
 - С. Гіперфункція кори наднирників, феохромоцитома
 - Д. Всі відповіді правильні
 - Е. Всі відповіді правильні, окрім А
5. Хворому на інсулінозалежний цукровий діабет було введено інсулін. Через деякий час у хворого з'явилися слабкість, дратівливість, посилене потовиділення. Який основний патогенетичний механізм розвитку гіпоглікемічної коми, що виникла?
- А. Посилення ліпогенезу
 - В. Посилення глікогенолізу
 - С. Вуглеводневе голодування головного мозку
 - Д. Посилення глікогенезу
 - Е. Зменшення глюконеогенезу
6. Хворий на цукровий діабетне отримав вчасно ін'єкцію інсуліну, що призвело до розвитку гіперглікемічної коми (глюкоза в крові – 50 ммоль/л). Який механізм є головним у розвитку цієї коми?
- А. Гіпоксія
 - В. Ацидоз
 - С. Гіпокаліємія
 - Д. Гіперосмія
 - Е. Гіпонатріємія
7. Під час обстеження хворого виявлено, що вміст глюкози в сечі становить 0,9%. Дані клінічного дослідження без патології. Вміст глюкози в крові становить 4,2 ммоль/л. Анамнез без особливостей. Яка можлива причина появи глюкози в сечі?
- А. Ниркова глюкозурія
 - В. Цукровий діабет
 - С. Нецукровий діабет
 - Д. Аліментарна гіперглікемія
 - Е. Гіпоглікемія

8. Чоловік віком 37 років хворіє на інсулінзалежний цукровий діабет. Після перенесеного простудного захворювання посилилися скарги на спрагу, нудоту, блювання, біль у животі, сонливість. Об'єктивно: шкіра суха, шумне дихання, язик сухий. Глюкоза крові – 28 ммоль/л. Яке ускладнення основного захворювання виникло у хворого?

- A. Гіперосмолярна кома
- B. Лактатацедимічна кома
- C. Кетоацидемічна кома
- D. Сепсис
- E. Печінкова кома

9. Який лабораторний показник є «золотим стандартом» діагностики цукрового діабету?

- A. Рівень глюкози натще серце
- B. Концентрація інсуліну
- C. Концентрація с-пептиду
- D. Вміст глікозованого гемоглобіну
- E. Вміст фруктозаміну

10. Пацієнт звернувся до лікаря зі скаргами на диспепсію, схуднення, м'язову слабкість. Лабораторні дослідження виявили вміст цукру в крові 12 ммоль/л, глюкозурію, кетонів тіла в сечі. Холестерин у крові - 26 ммоль/л, фосфоліпіди-19 ммоль/л. Коефіцієнт відношення холестерину до фосфоліпідів 1,37. Діагноз:

- A. Гіперфункція щитовидної залози
- B. Гострий панкреатит
- C. Цукровий діабет
- D. Дисліпопротеїнемія IV типу
- E. Пухлина мозку

5. ЛІТЕРАТУРА (див. на стор. 105)

Заняття №5

ТЕМА: Біохімічні маркери при порушенні функції гіпофізу

МЕТА: Розглянути біохімічні показники, що використовуються для лабораторного моніторингу та діагностики порушень функції гіпофізу

ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ ПІД ЧАС ПІДГОТОВКИ ТА

ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

- 1) Гіпоталамо-гіпофізарна система та регуляція її функціонування
- 2) Порушення синтезу гормонів у аденогіпофізі

- 3) Чинники, що впливають на лабораторну оцінку вмісту гормонів аденогіпофіза
- 4) Порушення синтезу гормонів у задній долі гіпофізу
- 5) Функціональні тести навантаження та їх використання для виявлення порушень у системі гіпоталамус – гіпофіз – ендокринна залоза

ПРАКТИЧНІ РОБОТИ, ЯКІ ВИКОНУЮТЬСЯ НА ЗАНЯТТІ

ПРОТОКОЛ № 5

Дата

1. Визначення тиреотропного гормону імуноферментним методом

Принцип методу: в наборі використовується «сендвіч»-варіант твердофазного імуноферментного аналізу. Для реалізації цього варіанту використані 2 моноклональних антитіла з різною специфічністю до тиреотропного гормону (ТТГ). Один з видів антитіл імобілізований на твердій фазі (внутрішній поверхні лунок), другий вид – зв'язаний з пероксидазою хрину. В лунках, при додаванні досліджуваного зразка та кон'югату анти-ТТГ-пероксидаза, під час інкубації одночасно відбувається імобілізація ТТГ, що знаходиться у досліджуваному зразку, та зв'язування його з кон'югатом. При видаленні вмісту з лунок та промиванні відбувається видалення надлишку кон'югату, який не зв'язався з ТТГ під час інкубації. Кількість зв'язаного кон'югату прямопропорційна кількості ТТГ у досліджуваному зразку.

Лінійність методу: 0,25 – 15,0 мкМОд/мл

Нормальні значення: 0,23 – 3,4 мкМОд/мл

Концентрація тиреотропного гормону стабільна протягом 2 діб при температурі +2 - +8⁰С, за умови, що сироватка чи плазма без слідів гемолізу.

Обладнання і реагенти:

- 1) Спектрофотометр вертикального сканування (ридер) з довжиною хвилі 450 нм
- 2) Шейкер-термостат з можливістю підтримування температури +37⁰С
- 3) Автоматичні піпетки на 0,05, 0,1 і 1 мл
- 4) Сироватка крові
- 5) Дистильована вода
- 6) Калібрувальні проби
- 7) Кон'югат анти-ТТГ-пероксидаза
- 8) Концентрат буферу для промивання
- 9) Розчин тетраметилбензидину (ТМБ)
- 10) Розчин соляної кислоти (стоп-реагент)

Проведення аналізу

1. Всі реагенти перед проведенням аналізу повинні бути доведені до кімнатної температури.
2. Внести по 0,05 мл калібрувальних та досліджуваних зразків у відповідні, відібрані для аналізу лунки
3. Додати у всі лунки по 0,1 мл кон'югату
4. Інкубувати стрип протягом 1 години при струшуванні та температурі +37° С
5. Приготувати буфер для промивання: 5 мл концентрату внести у мірну колбу на 100 мл, дистильованою водою довести до мітки
6. Після закінчення інкубації видалити вміст лунок, промити їх приготованим буферним розчином 5 разів
7. Внести у всі лунки по 0,1 мл розчину ТМБ
8. Інкубувати при кімнатній температурі 20 хв у темному місці
9. Додати у всі лунки по 0,1 мл розчину соляної кислоти (стоп-реагент)
10. Виміряти оптичну щільність у кожній лунці на ридері при довжині хвилі 450 нм

Розрахунок

Визначення вмісту тиреотропного гормону у кожній з дослідних проб проводиться за калібрувальним графіком з використанням програми імуноферментного ридеру

2. Визначення пролактину імуноферментним методом

Принцип методу: в наборі використовується «сендвіч»-варіант твердофазного імуноферментного аналізу. Для реалізації цього варіанту використані 2 моноклональних антитіла з різною специфічністю до пролактину. Один з видів антитіл іммобілізований на твердій фазі (внутрішній поверхні лунок), другий вид – зв'язаний з пероксидазою хрину. В лунках, при додаванні досліджуваного зразка та кон'югату анти-пролактин-пероксидаза, під час інкубації одночасно відбувається іммобілізація пролактину, що знаходиться у досліджуваному зразку, та зв'язування його з кон'югатом. При видаленні вмісту з лунок та промиванні відбувається видалення надлишку кон'югату, який не зв'язався з пролактином під час інкубації. Кількість зв'язаного кон'югату прямопропорційна кількості пролактину у досліджуваному зразку.

Лінійність методу: 0 – 100 000 мМОд/л

Нормальні значення: для чоловіків – 105 – 540 мМОд/л

для жінок - 67 – 726 мМОд/л

Концентрація пролактину стабільна протягом 2 діб при температурі +2 - +8° С, за умови, що сироватка чи плазма без слідів гемолізу.

Обладнання і реанти:

- 1) Спектрофотометр вертикального сканування (ридер) з довжиною хвилі 450 нм
- 2) Шейкер-термостат з можливістю підтримування температури +37⁰ С
- 3) Автоматичні піпетки на 0,05, 0,1 і 1 мл
- 4) Сироватка крові
- 5) Дистильована вода
- 6) Калібрувальні проби
- 7) Кон'югат анти-пролактин-пероксидаза
- 8) Концентрат буферу для промивання
- 9) Розчин тетраметилбензидину (ТМБ)
- 10) Розчин соляної кислоти (стоп-реагент)

Проведення аналізу

1. Всі реанти перед проведенням аналізу повинні бути доведені до кімнатної температури.
2. Внести по 0,02 мл калібрувальних та досліджуваних зразків у відповідні, відібрані для аналізу лунки
3. Додати у всі лунки по 0,15 мл кон'югату
4. Інкубувати стрип протягом 1 години при струшуванні та температурі +37⁰ С
5. Приготувати буфер для промивання: 5 мл концентрату внести у мірну колбу на 100 мл, дистильованою водою довести до мітки
6. Після закінчення інкубації видалити вміст лунок, промити їх приготованим буферним розчином 5 разів
7. Внести у всі лунки по 0,1 мл розчину ТМБ
8. Інкубувати при кімнатній температурі 20 хв у темному місці
9. Додати у всі лунки по 0,1 мл розчину соляної кислоти (стоп-реагент)
10. Виміряти оптичну щільність у кожній лунці на ридері при довжині хвилі 450 нм

Розрахунок

Визначення вмісту пролактину у кожній з дослідних проб проводиться за калібрувальним графіком з використанням програми імуноферментного ридеру

3. Визначення адренкортикотропного гормону (АКТГ) імуноферментним методом

Принцип методу: в наборі використовується «сендвіч»-варіант твердофазного імуноферментного аналізу.

Лінійність методу: 0 – 500 пг/мл

Нормальні значення: 8,3 – 57,8 пг/мл

Концентрація АКТГ стабільна протягом 2 годин при температурі +2 - +8⁰ С, за умови, що сироватка чи плазма без слідів гемолізу. При необхідності тривалого зберігання необхідно заморозити проби при -70⁰С.

Обладнання і реagenти:

- 1) Спектрофотометр вертикального сканування (ридер) з довжиною хвилі 450 нм
- 2) Автоматичні піпетки на 0,025, 0,2 і 1 мл
- 3) Сироватка крові
- 4) Дистильована вода
- 5) Калібрувальні проби
- 6) Концентрат буферу для промивання
- 7) Ензимний кон'югат
- 8) Розчин біотинолових антитіл
- 9) Розчин тетраметилбензидину (ТМБ)
- 10) Розчин соляної кислоти (стоп-реагент)

Проведення аналізу

1. Всі реagenти перед проведенням аналізу повинні бути доведені до кімнатної температури.
2. Внести по 0,2 мл калібрувальних та досліджуваних зразків у відповідні, відібрані для аналізу лунки
3. Додати у всі лунки по 0,025 мл розчину біотинолових антитіл
4. Додати у всі лунки по 0,025 мл розчину кон'югату
5. Інкубувати стрип протягом 4 годин при кімнатній температурі на орбітальному шейкері
6. Приготувати буфер для промивання: 5 мл концентрату внести у мірну колбу на 100 мл, дистильованою водою довести до мітки
7. Після закінчення інкубації видалити вміст лунок, промити їх приготованим буферним розчином 5 разів
8. Внести у всі лунки по 0,15 мл розчину ТМБ
9. Витримати 30 хв у темному місці для розвитку забарвлення
10. Додати у всі лунки по 0,1 мл розчину сірчаної кислоти (стоп-реагент)
11. Виміряти оптичну щільність у кожній лунці на ридері при довжині хвилі 450 нм

Розрахунок

Визначення вмісту АКТГ у кожній з дослідних проб проводиться за калібрувальним графіком з використанням програми імуноферментного ридеру

МАТЕРІАЛИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. Які фізіологічні ефекти викликає тиреотропний гормон?
 - A. Знижує продукцію тиреоїдних гормонів
 - B. Стимулює синтез тиреоїдних гормонів
 - C. Підвищує рівень глюкози
 - D. Регулює обмін кальцію
 - E. Посилює розпад білків
2. До гормонів гіпофізу глікопротеїдної природи відносяться:

- A. Адренкортикотропний гормон
 - B. Пролактин
 - C. Лютеїнізуючий гормон
 - D. Тиреотропний гормон
 - E. Всі відповіді правильні
3. Які гормони синтезуються нейрогіпофізом?
- A. Вазопресин
 - B. Пролактин
 - C. Соматотропний гормон
 - D. Фолікулостимулюючий гормон
 - E. Альдостерон
4. Ефекторною ендокринною залозою для гормону росту є:
- A. Щитовидна залоза
 - B. Гіпоталамус
 - C. Підшлункова залоза
 - D. Тимус
 - E. Статеві залози
5. При надлишку якого гормону розвивається синдром Іценко-Кушинга?
- A. Соматотропний гормон
 - B. Фолікулостимулюючий гормон
 - C. Окситоцин
 - D. Норадреналін
 - E. Адренкортикотропний гормон
6. Дефіцит якого гормону викликає появу нецукрового діабету?
- A. Інсуліну
 - B. Вазопресину
 - C. Гормону росту
 - D. Тиреотропного гормону
 - E. Альдостерону
7. Ацидофільні пухлини гіпофізу характеризуються підвищеним рівнем в крові:
- A. Тиреотропного гормону
 - B. Адренкортикотропного гормону
 - C. Гормону росту
 - D. Меланоцитстимулюючого гормону
 - E. Всі відповіді правильні
8. Середня (проміжна) зона гіпофізу виділяє в кров:
- A. Ліпотропін
 - B. Окситоцин
 - C. Соматотропін
 - D. Меланоцитстимулюючий гормон
 - E. Пролактин

9. У хворого спостерігається значне збільшення добового діурезу без глюкозурії. Який гормональний препарат можна рекомендувати для замісної терапії?

- A. Альдостерон
- B. Тиреоїдин
- C. Вазопресин
- D. Інсулін
- E. Адреналін

10. Хворий віком 23 роки скаржиться на головний біль, зміну зовнішнього вигляду (збільшення розмірів ніг, рис обличчя), огрубіння голосу, погіршення пам'яті. Захворювання почалося приблизно 3 року тому без видимих причин. Об'єктивно: збільшення надбрівних дуг, носа, язика. Аналіз сечі без особливих змін. Причиною такого стану може бути:

- A. Гіперпродукція соматотропіну
- B. Дефіцит альдостерону
- C. Гіперпродукція кортикостероїдів
- D. Дефіцит глюкагону
- E. Надлишок тироксину

5. ЛІТЕРАТУРА (див. на стор. 105)

Заняття №6

ТЕМА: Біохімічні маркери при порушенні функції щитоподібної залози

МЕТА: Розглянути біохімічні показники, що використовуються для лабораторного моніторингу та діагностики порушень функції щитовидної залози

ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ ПІД ЧАС ПІДГОТОВКИ ТА

ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

- 1) Гормони щитоподібної залози та їхня фізіологічна дія
- 2) Синтез та секреція гормонів щитоподібної залози
- 3) Регуляція функції щитоподібної залози
- 4) Гіпертиреоз: клінічна картина, види, лабораторна діагностика
- 5) Гіпотиреоз: клінічна картина, види, лабораторна діагностика
- 6) Гормони прищитоподібних залоз та їх фізіологічна роль
- 7) Порушення функцій прищитоподібних залоз

Теми для рефератів:

Лабораторна діагностика субклінічних стадій гіпотиреозу

ПРАКТИЧНІ РОБОТИ, ЯКІ ВИКОНУЮТЬСЯ НА ЗАНЯТТІ

ПРОТОКОЛ № 6

Дата

1. Визначення тироксину імуноферментним методом

Принцип методу: В лунках, при додаванні розчину АНС-Т₄, досліджуваного зразка та кон'югату, під час інкубації встановлюється рівновага між кон'югатом та ендogenous тироксином сироватки у процесі зв'язування з антитілами, які іммобілізовані на внутрішній поверхні лунок. Кількість зв'язаного антитілами кон'югату обернено пропорційна кількості тироксину у досліджуваному зразку.

Лінійність методу: 3,0 – 100,0 пмоль/л

Нормальні значення: 10,0 – 23,2 пмоль/л

Концентрація тироксину вільного стабільна протягом 2 діб при температурі +2 - +8⁰ С, за умови, що сироватка чи плазма без слідів гемолізу.

Обладнання і реагенти:

- 1) Спектрофотометр вертикального сканування (ридер) з довжиною хвилі 450 нм
- 2) Шейкер-термостат з можливістю підтримування температури +37⁰ С
- 3) Автоматичні піпетки на 0,02; 0,1; 0,15 і 1 мл
- 4) Сироватка крові
- 5) Дистильована вода
- 6) Калібрувальні проби
- 7) Кон'югат Т₄-пероксидаза
- 8) Концентрат буферу для промивання
- 9) Розчин тетраметилбензидину (ТМБ)
- 10) Розчин соляної кислоти (стоп-реагент)

Проведення аналізу

1. Всі реагенти перед проведенням аналізу повинні бути доведені до кімнатної температури.
2. Внести по 0,02 мл калібрувальних та досліджуваних зразків у відповідні, відібрані для аналізу лунки
3. Додати у всі лунки по 0,1 мл кон'югату
4. Додати у всі лунки по 0,1 мл розчину АНС-Т₄
5. Інкубувати стрип протягом 1 години при струшуванні та температурі +37⁰ С

6. Приготувати буфер для промивання: 5 мл концентрату внести у мірну колбу на 100 мл, дистильованою водою довести до мітки
7. Після закінчення інкубації видалити вміст лунок, промити їх приготованим буферним розчином 5 разів
8. Внести у всі лунки по 0,1 мл розчину ТМБ
9. Інкубувати при кімнатній температурі 20 хв у темному місці
10. Додати у всі лунки по 0,1 мл розчину соляної кислоти (стоп-реагент)
11. Виміряти оптичну щільність у кожній лунці на ридері при довжині хвилі 450 нм

Розрахунок

Визначення вмісту вільного тироксину у кожній з дослідних проб проводиться за калібрувальним графіком з використанням програми імуноферментного ридеру

2. Визначення трийодтироніну загального імуноферментним методом

Принцип методу: В лунках, при додаванні розчину АНС-Т₃, досліджуваного зразка та кон'югату, під час інкубації встановлюється рівновага між кон'югатом та ендogenous трийодтироніном сироватки у процесі зв'язування з антитілами, які іммобілізовані на внутрішній поверхні лунок. Кількість зв'язаного антитілами кон'югату обернено пропорційна кількості трийодтироніну у досліджуваному зразку.

Лінійність методу: 0,05 – 20,0 пмоль/л

Нормальні значення: 0,5 – 2,2 пмоль/л

Концентрація трийодтироніну стабільна протягом 2 діб при температурі +2 - +8⁰ С, за умови, що сироватка чи плазма без слідів гемолізу.

Обладнання і реагенти:

- 1) Спектрофотометр вертикального сканування (ридер) з довжиною хвилі 450 нм
- 2) Шейкер-термостат з можливістю підтримування температури +37⁰ С
- 3) Автоматичні піпетки на 0,02; 0,1; 0,15 і 1 мл
- 4) Сироватка крові
- 5) Дистильована вода
- 6) Калібрувальні проби
- 7) Кон'югат Т₃-пероксидаза
- 8) Концентрат буферу для промивання
- 9) Розчин тетраметилбензидину (ТМБ)
- 10) Розчин соляної кислоти (стоп-реагент)

Проведення аналізу

12. Всі реагенти перед проведенням аналізу повинні бути доведені до кімнатної температури.
13. Внести по 0,05 мл калібрувальних та досліджуваних зразків у відповідні, відібрані для аналізу лунки

14. Додати у всі лунки по 0,1 мл кон'югату
15. Додати у всі лунки по 0,1 мл розчину антитіл АНС-Т₃
16. Інкубувати стрип протягом 1 години при струшуванні та температурі +37⁰ С
17. Приготувати буфер для промивання: 5 мл концентрату внести у мірну колбу на 100 мл, дистильованою водою довести до мітки
18. Після закінчення інкубації видалити вміст лунок, промити їх приготованим буферним розчином 5 разів
19. Внести у всі лунки по 0,1 мл розчину ТМБ
20. Інкубувати при кімнатній температурі 20 хв у темному місці
21. Додати у всі лунки по 0,1 мл розчину соляної кислоти (стоп-реагент)
22. Виміряти оптичну щільність у кожній лунці на ридері при довжині хвилі 450 нм

Розрахунок

Визначення вмісту трийодтироніну загального у кожній з дослідних проб проводиться за калібрувальним графіком з використанням програми імуноферментного ридеру

4. Визначення антитіл до тиреоїдної пероксидази (ТПО) імуноферментним методом

Принцип методу: на першій стадії аналізу антитіла до ТПО, що містяться у калібрувальних та досліджуваних пробах, зв'язуються з ТПО, яка фіксована на внутрішній поверхні лунок. На другій стадії аналізу іммобілізовані антитіла до ТПО зв'язуються кон'югатом з пероксидазою. Кількість зв'язаного кон'югату прямо пропорційна кількості антитіл до ТПО у досліджуваному зразку.

Лінійність методу: 25 – 500 Од/мл

Нормальні значення: 5 – 30 Од/мл

Концентрація антитіл до ТПО стабільна протягом 2 діб при температурі +2 - +8⁰ С, за умови, що сироватка чи плазма без слідів гемолізу.

Обладнання і реагенти:

- 1) Спектрофотометр вертикального сканування (ридер) з довжиною хвилі 450 нм
- 2) Шейкер-термостат з можливістю підтримування температури +37⁰ С
- 3) Автоматичні піпетки на 0,02; 0,1; 0,15 і 1 мл
- 4) Сироватка крові
- 5) Дистильована вода
- 6) Калібрувальні проби
- 7) Буфер А
- 8) Кон'югат-пероксидаза
- 9) Концентрат буферу для промивання
- 10) Розчин тетраметилбензидину (ТМБ)

11) Розчин соляної кислоти (стоп-реагент)

Проведення аналізу

1. Всі реагенти перед проведенням аналізу повинні бути доведені до кімнатної температури.
2. Досліджувану сироватку розвести у 20 разів буфером для розведення (буфер Д)
3. Внести по 0,05 мл калібрувальних та розведених досліджуваних зразків у відповідні, відібрані для аналізу лунки
4. Додати у всі лунки по 0,1 мл буферу А
5. Інкубувати стрип протягом 1 години при струшуванні та температурі +37⁰С
6. Приготувати буфер для промивання: 5 мл концентрату внести у мірну колбу на 100 мл, дистильованою водою довести до мітки
7. Після закінчення інкубації видалити вміст лунок, промити їх приготованим буферним розчином 5 разів
8. Додати у всі лунки по 0,12 мл розчину кон'югату
9. Інкубувати стрип протягом 1 години при струшуванні та температурі +37⁰С
10. Після закінчення інкубації видалити вміст лунок, промити їх приготованим буферним розчином 5 разів
11. Внести у всі лунки по 0,1 мл розчину ТМБ
12. Інкубувати при кімнатній температурі 20 хв у темному місці
13. Додати у всі лунки по 0,1 мл розчину соляної кислоти (стоп-реагент)
14. Виміряти оптичну щільність у кожній лунці на ридері при довжині хвилі 450 нм

Розрахунок

Визначення вмісту антитіл до ТПО у кожній з дослідних проб проводиться за калібрувальним графіком з використанням програми імуноферментного ридеру

Визначення антитіл до тиреоглобуліну (ТГ) імуноферментним методом

Принцип методу: на першій стадії аналізу антитіла до тиреоглобуліну, що містяться у калібрувальних та досліджуваних пробах, зв'язуються з тиреоглобуліном, який фіксований на внутрішній поверхні лунок. На другій стадії аналізу імібілізовані антитіла до ТГ зв'язуються кон'югатом з пероксидазою. Кількість зв'язаного кон'югату прямо пропорційна кількості антитіл до ТГ у досліджуваному зразку.

Лінійність методу: 50 – 1200 Од/мл

Нормальні значення: 5 – 65 Од/мл

Концентрація антитіл до тиреоглобуліну стабільна протягом 2 діб при температурі +2 - +8⁰С, за умови, що сироватка чи плазма без слідів гемолізу.

Обладнання і реagenти:

- 1) Спектрофотометр вертикального сканування (ридер) з довжиною хвилі 450 нм
- 2) Шейкер-термостат з можливістю підтримування температури +37° С
- 3) Автоматичні піпетки на 0,02; 0,1; 0,15 і 1 мл
- 4) Сироватка крові
- 5) Дистильована вода
- 6) Калібрувальні проби
- 7) Кон'югат-пероксидаза
- 8) Буфер А
- 9) Концентрат буферу для промивання
- 10) Розчин тетраметилбензидину (ТМБ)
- 11) Розчин соляної кислоти (стоп-реагент)

Проведення аналізу

1. Всі реагенти перед проведенням аналізу повинні бути доведені до кімнатної температури.
2. Внести по 0,05 мл калібрувальних та ослідуваних зразків у відповідні, відібрані для аналізу лунки
3. Додати у всі лунки по 0,1 мл буферу А
4. Інкубувати стрип протягом 30 хвилин при струшуванні та температурі +37° С
5. Приготувати буфер для промивання: 5 мл концентрату внести у мірну колбу на 100 мл, дистильованою водою довести до мітки
6. Після закінчення інкубації видалити вміст лунок, промити їх приготованим буферним розчином 5 разів
7. Додати у всі лунки по 0,12 мл розчину кон'югату
8. Інкубувати стрип протягом 30 хвилин при струшуванні та температурі +37° С
9. Після закінчення інкубації видалити вміст лунок, промити їх приготованим буферним розчином 5 разів
10. Внести у всі лунки по 0,1 мл розчину ТМБ
11. Інкубувати при кімнатній температурі 20 хв у темному місці
12. Додати у всі лунки по 0,1 мл розчину соляної кислоти (стоп-реагент)
13. Виміряти оптичну щільність у кожній лунці на ридері при довжині хвилі 450 нм

Розрахунок

Визначення вмісту антитіл до тиреоглобуліну у кожній з дослідних проб проводиться за калібрувальним графіком з використанням програми імуноферментного ридеру

МАТЕРІАЛИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. Які з перелічених лабораторних даних характерні для гіпотиреозу?

- A. Гіперхолестеринемія, підвищений вміст тригліцеридів і фосфоліпідів у крові
 - B. Зниження вмісту альбумінів
 - C. Збільшення альфа₂- і бета-глобулінів
 - D. Нормальний або знижений рівень глюкози в крові натще
 - E. Всі відповіді правильні
2. Які процеси в організмі регулюють тиреоїдні гормони?
- A. Збільшують теплопродукцію та потребу тканин у кисні
 - B. Прискорюють обмін білків
 - C. Стимулюють синтез вітаміну А
 - D. Знижують концентрацію холестерину та тригліцеридів
 - E. Всі відповіді правильні
3. Яка роль паратиреоїдного гормону в організмі людини?
- A. Регулює рівень тиреотропного гормону
 - B. Регулює синтез тироксину
 - C. Зв'язує тиреоїдні гормони, знижуючи їхню активність
 - D. Регулює метаболізм кальцію та фосфору в організмі
 - E. Всі відповіді правильні
4. Яка амінокислота бере участь у синтезі тиреоїдних гормонів?
- A. Гліцин
 - B. Метіонін
 - C. Тирозин
 - D. Фенілаланін
 - E. Триптофан
5. Який із перелічених методів визначення гормонів найбільш специфічний?
- A. Радіоімунологічний
 - B. Імуноферментний
 - C. Флюорометричний
 - D. Спектрофотометричний
 - E. Імунохроматографічний
6. Чоловік віком 25 років протягом 2 – 3 років скаржиться на посилення головного болю, апатію, збільшення маси тіла. Ріст 168 см, маса тіла 72 кг. Шкіра бліда, холодна, суха. Випадіння волосся. Щитоподібна залоза не збільшена. Рівень ТТГ – 30 мкг/л, СТГ – 3 мкг/л. Рівень гонадотропних гормонів без змін. Визначте, які порушення пов'язані з таким станом:
- A. Гіпотиреоз
 - B. Гіпопітуїтаризм
 - C. Акромегалія
 - D. Вторинний гіпогонадизм
 - E. Аліментарне ожиріння
7. У хворого на ендокринну патологію спостерігаються тахікардія, підвищення температури тіла, дратівливість, схуднення, від'ємний азотистий баланс. Підвищення концентрації якого гормону може призвести до такого стану?

- A. Вазопресину
 - B. Тироксину
 - C. Соматотропіну
 - D. Інсуліну
 - E. Глюкагону
8. У хворого встановили тиреотоксикоз, що виявляється підвищенням тиреоїдних гормонів (Т₃ та Т₄). Це захворювання призвело до схуднення, тахікардії та психічної збудливості. Укажіть, як тиреоїдні гормони впливають на енергетичний обмін у мітохондріях:
- A. Блокують дихальний ланцюг
 - B. Активують субстратне фосфорилування
 - C. Блокують субстратне фосфорилування
 - D. Роз'єднують окислення та окисне фосфорилування
 - E. Активують окисне фосфорилування
9. у дитини виявлено гіпокальціємію та гіперфосфатемію. Який з наведених гормональних препаратів рекомендується використовувати в комплексному лікуванні для усунення цих симптомів?
- A. Тироїдин
 - B. Паратгормон
 - C. Вазопресин
 - D. L-тироксин
 - E. Вазопресин
10. Дані лабораторного дослідження: ТТГ – 1,7 мкМОд/мл, вільний тироксин – 15,3 пмоль/л, антитіла до ТПО – 114 Од/мл, антитіла до ТГ – 74 Од/мл.
Попередній діагноз:
- A. Гіпотиреоз
 - B. Хронічний аутоімунний тиреоїдит
 - C. Дифузний токсичний зоб
 - D. Дифузний нетоксичний зоб
 - E. Еутиреоз

5. ЛІТЕРАТУРА (див. на стор.)

Заняття №7

ТЕМА: Біохімічні маркери при порушенні функції наднирників

МЕТА: Розглянути біохімічні показники, що використовуються для лабораторного моніторингу та діагностики порушень функції наднирників

ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ ПІД ЧАС ПІДГОТОВКИ ТА

ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

- 1) Гормони кори надниркових залоз, їх класифікація

- 2) Синтез стероїдних гормонів
- 3) Глюкокортикоїди, їхня біологічна роль
- 4) Лабораторні методи оцінки глюкокортикоїдної активності наднирників
- 5) Мінералокортикоїди, їх роль у регуляції водно-електролітного обміну
- 6) Андростанові стероїдні гормони кори наднирників
- 7) Естранові стероїдні гормони кори наднирників
- 8) Недостатність кори надниркових залоз, лабораторна діагностика та клінічна картина
- 9) Гіперфункція кори наднирників (синдром Конна, синдром Іценко-Кушинга, андрогенітальний синдром)
- 10) Гормони мозкової частини наднирників
- 11) Особливості лабораторного дослідження гормонів наднирників

Теми для рефератів:

- Клініко-діагностичне значення визначення 17-кетостероїдів у сечі ня

ПРАКТИЧНІ РОБОТИ, ЯКІ ВИКОНУЮТЬСЯ НА ЗАНЯТТІ

ПРОТОКОЛ № 7

Дата

1. Визначення рівня кортизолу імуноферментним методом

Принцип методу: конкурентний імуноферментний аналіз. Кортизол досліджуваного зразка та кортизол, зв'язаний з стрептавідином конкурують за зв'язування з антитілами до кортизолу, що нанесені на дно лунок планшету. Інтенсивність забарвлення субстратного розчину обернено пропорційна кількості кортизолу у досліджуваному зразку.

Нормальні значення: у сироватці крові – 140 – 600 нмоль/л

Концентрація кортизолу стабільна протягом 8 годин при температурі +2 - +8⁰ С, за умови, що сироватка чи плазма без слідів гемолізу.

Обладнання і реагенти:

- 1) Спектрофотометр вертикального сканування (ридер) з довжиною хвилі 450 нм
- 2) Шейкер-термостат з можливістю підтримування температури +37⁰ С
- 3) Автоматичні піпетки на 0,02; 0,1; 0,15 і 1 мл

- 4) Сироватка крові
- 5) Дистильована вода
- 6) Калібрувальні проби
- 7) Розчин кон'югату
- 8) Концентрат буферу для промивання
- 9) Розчин субстрату
- 10) Розчин соляної кислоти (стоп-реагент)

Проведення аналізу

1. Всі реагенти перед проведенням аналізу повинні бути доведені до кімнатної температури.
2. Внести по 0,02 мл калібрувальних та осліджуваних зразків у відповідні, відібрані для аналізу лунки
3. Додати у всі лунки по 0,1 мл кон'югату
4. Інкубувати стрип протягом 60 хвилин при кімнатній температурі
5. Після закінчення інкубації видалити вміст лунок, промити їх дистильованою водою 5 разів
6. Додати у всі лунки по 0,1 мл розчину субстрату
7. Інкубувати стрип протягом 20 хвилин при кімнатній температурі у темному місці
8. Додати у всі лунки по 0,1 мл розчину соляної кислоти (стоп-реагент)
9. Виміряти оптичну щільність у кожній лунці на ридері при довжині хвилі 450 нм

Розрахунок

Визначення вмісту кортизолу у кожній з дослідних проб проводиться за калібрувальним графіком з використанням програми імуноферментного ридеру

2. Визначення вмісту дигідроепіандростерон-сульфату (ДГЕА-сульфату) імуноферментним методом

Принцип методу: конкурентний імуноферментний аналіз. При одночасному додаванні у лунки планшету зразка, кон'югату та антитіл до ДГЕА-сульфату під час інкубації встановлюється рівновага між кон'югатом та ДГЕА-сульфатом сироватки у процесі їх зв'язування з антитілами, що нанесені на дно лунок планшету. Інтенсивність забарвлення обернено пропорційна концентрації ДГЕА-сульфату у досліджуваному зразку.

Нормальні значення: чоловіки – 1,0 – 4,2 мкг/мл

жінки – 0,8 – 3,9 мкг/мл

менопауза – 0,1 – 2,5 мкг/мл

вагітні – 0,2 – 1,2 мкг/мл

Концентрація ДГЕА-сульфату стабільна протягом 8 годин при температурі +2 - +8⁰ С, за умови, що сироватка чи плазма без слідів гемолізу.

Обладнання і реagenти:

- 1) Спектрофотометр вертикального сканування (ридер) з довжиною хвилі 450 нм
- 2) Шейкер-термостат з можливістю підтримування температури +37° С
- 3) Автоматичні піпетки на 0,02; 0,1; 0,15 і 1 мл
- 4) Сироватка крові
- 5) Дистильована вода
- 6) Калібрувальні проби
- 7) Кон'югат-пероксидаза
- 8) Розчин антитіл до ДГЕА-сульфату
- 9) Концентрат буферу для промивання
- 10) Розчин тетраметилбензидину (ТМБ)
- 11) Розчин соляної кислоти (стоп-реагент)

Проведення аналізу

1. Всі реагенти перед проведенням аналізу повинні бути доведені до кімнатної температури.
2. Внести по 0,05 мл калібрувальних та осліджуваних зразків у відповідні, відібрані для аналізу лунки
3. Додати у всі лунки по 0,1 мл розчину кон'югату
4. Додати у всі лунки по 0,1 мл розчину антитіл до ДГЕА-сульфату
5. Інкубувати стрип протягом 60 хвилин при струшуванні та температурі +37° С
6. Приготувати буфер для промивання: 5 мл концентрату внести у мірну колбу на 100 мл, дистильованою водою довести до мітки
7. Після закінчення інкубації видалити вміст лунок, промити їх приготованим буферним розчином 5 разів
8. Внести у всі лунки по 0,1 мл розчину ТМБ
9. Інкубувати при кімнатній температурі 20 хв у темному місці
10. Додати у всі лунки по 0,1 мл розчину соляної кислоти (стоп-реагент)
11. Виміряти оптичну щільність у кожній лунці на ридері при довжині хвилі 450 нм

Розрахунок

Визначення вмісту ДГЕА-сульфату у кожній з дослідних проб проводиться за калібрувальним графіком з використанням програми імуноферментного ридеру

МАТЕРІАЛИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. При яких захворюваннях вміст глюкокортикоїдів у плазмі крові підвищується?
 - А. Хвороба Іценко-Кушинга
 - В. Феохромоцитома
 - С. Мікседема

- D. Рахіт
 - E. Всі відповіді правильні
2. При яких захворюваннях концентрація глюкокортикоїдів у плазмі крові знижується?
- A. Хвороба Іценко-Кушинга
 - B. Хронічна недостатність наднирників
 - C. Рак яєчників
 - D. Простатит
 - E. Феохромацитома
3. При яких захворюваннях концентрація 17-ОКС у плазмі крові знижується?
- A. Аденомі кори наднирників
 - B. При раку кори наднирників
 - C. Гіперплазії кори наднирників
 - D. Хронічній недостатності кори наднирників
 - E. Всі відповіді правильні
4. Які з перелічених станів супроводжуються нестійким збільшенням 17-ОКС?
- A. Нервово-емоційні напруження
 - B. Важка фізична робота у нетренованих людей
 - C. Травми
 - D. Хірургічні операції
 - E. Всі відповіді правильні
5. Про що свідчить зниження екскреції 17-ОКС?
- A. Про розвиток гіперкортицизму в результаті пухлини гіпофіза
 - B. Нервово-емоційне напруження
 - C. Про розвиток гіпокортицизму внаслідок поразки наднирників або тривалої стероїдної терапії
 - D. Тривалу стероїдну терапію
 - E. Всі відповіді правильні
6. При якому захворюванні концентрація 17-ОКС у сечі підвищена?
- A. Хвороба Аддісона
 - B. Цироз печінки
 - C. Рак кори наднирників
 - D. Гіпотеріоз
 - E. Всі відповіді правильні
7. Про що свідчить зменшення екскреції 17-ОКС?
- A. Про гіперсекрецію глюкокортикоїдів
 - B. Ознака зниженої продукції чоловічих статевих гормонів
 - C. Про знижену продукцію глюкокортикоїдів
 - D. Ознака зниженої продукції чоловічих статевих гормонів і глюкокортикоїдів
 - E. Важка фізична робота у нетренованих людей
8. Які речовини використовують у якості консерванту при зборі сечі для визначення гормонів кори наднирників?

- A. Хлороформ або толуол
 - B. Льодяна оцтова кислота
 - C. Тимол
 - D. Бензол
 - E. Формалін
9. Для якого захворювання підвищення екскреції катехоламінів із сечею є специфічним тестом?
- A. Гіпертонічна хвороба
 - B. Гострий інфаркт міокарда
 - C. Феохромоцитома
 - D. Бронхіальна астма
 - E. Всі відповіді правильні
10. Вкажіть, вплив яких факторів необхідно враховувати при визначенні катехоламінів:
- A. Прийом кави, кофеїну
 - B. Застосування рентген контрастних препаратів
 - C. Прийом ацетилсаліцилової кислоти
 - D. Прийом гіпотензивних засобів
 - E. Всі відповіді правильні

5. ЛІТЕРАТУРА (див. на стор.)

Заняття №8

ТЕМА: Біохімічні дослідження при патології статевої системи

МЕТА: Розглянути біохімічні показники, що використовуються для лабораторного моніторингу та діагностики порушень функції статевих залоз

ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ ПІД ЧАС ПІДГОТОВКИ ТА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

- 1) Жіночі статеві гормони, регуляція синтезу та біологічна роль
- 2) Чоловічі статеві гормони, регуляція синтезу, біологічна роль
- 3) Регуляція функціонування статевих залоз системою гіпоталамус – гіпофіз – гонади
- 4) Порушення функцій статевих залоз
- 5) Лабораторні методи, які використовуються для дослідження статевих гормонів

Теми для рефератів:

- Діагностика порушень в системі гіпоталамус – гіпофіз – статеві залози

ПРАКТИЧНІ РОБОТИ, ЯКІ ВИКОНУЮТЬСЯ НА ЗАНЯТТІ

ПРОТОКОЛ № 8

Дата

1. Визначення естрадіолу в сироватці крові

Принцип методу: конкурентний імуноферментний аналіз. Естрадіол досліджуваного зразку конкурує з естрадіолом, кон'югованим з пероксидазою, за місця зв'язування з антитілами проти естрадіолу на дні лунок планшету. Кількість зв'язаного кон'югата пероксидази з антитілами обернено пропорційна концентрації естрадіолу в сироватці крові.

Чутливість методу: 9,7 пг/мл

Нормальні значення: для чоловіків 15 – 70 пг/мл

для жінок у фолікуліновій фазі 10 – 160 пг/мл

овуляція 34 – 400 пг/мл

у лютеїновій фазі 27 – 246 пг/мл

менопауза до 30 пг/мл

Концентрація естрадіолу стабільна протягом 7 діб при температурі +2 - +8⁰С, за умови, що сироватка чи плазма без слідів гемолізу.

Обладнання і реагенти:

- 1) Спектрофотометр вертикального сканування (ридер) з довжиною хвилі 450 нм
- 2) Шейкер-термостат з можливістю підтримування температури +37⁰С
- 3) Автоматичні піпетки на 0,02; 0,1; 0,15 і 1 мл
- 4) Сироватка крові
- 5) Дистильована вода
- 6) Калібрувальні проби
- 7) Кон'югат естрадіол-пероксидаза
- 8) Концентрат буферу для промивання
- 9) Розчин тетраметилбензидину (ТМБ)
- 10) Розчин соляної кислоти (стоп-реагент)

Проведення аналізу

1. Всі реагенти перед проведенням аналізу повинні бути доведені до кімнатної температури.
2. Внести по 0,025 мл калібрувальних та досліджуваних зразків у відповідні, відібрані для аналізу лунки
3. Додати у всі лунки по 0,2 мл кон'югату

4. Інкубувати стрип протягом 2 годин при кімнатній температурі
5. Приготувати буфер для промивання: 4 мл концентрату внести у мірну колбу на 100 мл, дистильованою водою довести до мітки
6. Після закінчення інкубації видалити вміст лунок, промити їх приготованим буферним розчином 3 рази
7. Внести у всі лунки по 0,2 мл розчину ТМБ
8. Інкубувати при кімнатній температурі 20 хв у темному місці
9. Додати у всі лунки по 0,1 мл розчину соляної кислоти (стоп-реагент)
10. Виміряти оптичну щільність у кожній лунці на ридері при довжині хвилі 450 нм

Розрахунок

Визначення вмісту естрадіолу у кожній з дослідних проб проводиться за калібрувальним графіком з використанням програми імуноферментного ридеру

2. Визначення тестостерону імуноферментним методом

Принцип методу: конкурентний імуноферментний аналіз. Тестостерон досліджуваного зразку конкурує з тестостероном, кон'югованим з пероксидазою, за місця зв'язування з антитілами проти тестостерону на дні лунок планшету. Кількість зв'язаного кон'югата пероксидази з антитілами обернено пропорційна концентрації тестостерону в сироватці крові.

Чутливість методу: 0,2 нмоль/л

Нормальні значення: чоловіки: 12,1 – 38,3 нмоль/л

жінки: 0,1 – 4,3 нмоль/л

Концентрація тестостерону стабільна протягом 7 діб при температурі +2 - +8⁰ С, за умови, що сироватка чи плазма без слідів гемолізу.

Обладнання і реагенти:

- 1) Спектрофотометр вертикального сканування (ридер) з довжиною хвилі 450 нм
- 2) Автоматичні піпетки на 0,025, 0,05 і 1 мл
- 3) Сироватка крові
- 4) Дистильована вода
- 5) Калібрувальні проби
- 6) Концентрат буферу для промивання
- 7) Ензимний кон'югат
- 8) Розчин тетраметилбензидину (ТМБ)
- 9) Розчин соляної кислоти (стоп-реагент)

Проведення аналізу

1. Всі реагенти перед проведенням аналізу повинні бути доведені до кімнатної температури.

2. Внести по 0,05 мл калібрувальних та досліджуваних зразків у відповідні, відібрані для аналізу лунки
3. Додати у всі лунки по 0,15 мл ензимного кон'югату
4. Інкубувати стрип протягом 90 хвилин при кімнатній температурі
5. Приготувати буфер для промивання: 5 мл концентрату внести у мірну колбу на 100 мл, дистильованою водою довести до мітки
6. Після закінчення інкубації видалити вміст лунок, промити їх приготованим буферним розчином 5 разів
7. Внести у всі лунки по 0,1 мл розчину ТМБ
8. Витримати 20 хв у темному місці для розвитку забарвлення
9. Додати у всі лунки по 0,1 мл розчину сірчаної кислоти (стоп-реагент)
10. Виміряти оптичну щільність у кожній лунці на ридері при довжині хвилі 450 нм

Розрахунок

Визначення вмісту тестостерону у кожній з дослідних проб проводиться за калібрувальним графіком з використанням програми імуноферментного ридеру

3. Визначення вмісту прогестерону в сироватці крові імуноферментним методом

Принцип методу: конкурентний імуноферментний аналіз. Прогестерон досліджуваного зразку конкурує з прогестероном, кон'югованим з пероксидазою, за місця зв'язування з антитілами проти прогестерону на дні лунок планшету. Кількість зв'язаного кон'югата пероксидази з антитілами обернено пропорційна концентрації прогестерону в сироватці крові.

Чутливість методу: 0,5 нмоль/л

Нормальні значення: чоловіки: 0,5 – 5,2 нмоль/л

жінки: фолікулінова фаза – 0,5 – 6,0 нмоль/л

лютеїнова фаза – 10 – 89 нмоль/л

Концентрація прогестерону стабільна протягом 2 діб при температурі +2 - +8⁰ С, за умови, що сироватка чи плазма без слідів гемолізу.

Обладнання і реагенти:

- 1) Спектрофотометр вертикального сканування (ридери) з довжиною хвилі 450 нм
- 2) Шейкер-термостат з можливістю підтримування температури +37⁰ С
- 3) Автоматичні піпетки на 0,02; 0,1; 0,15 і 1 мл
- 4) Сироватка крові
- 5) Дистильована вода
- 6) Калібрувальні проби
- 7) Розчин кон'югату
- 8) Концентрат буферу для промивання
- 9) Розчин тетраметилбензидину (ТМБ)

10) Розчин соляної кислоти (стоп-реагент)

Проведення аналізу

1. Всі реагенти перед проведенням аналізу повинні бути доведені до кімнатної температури.
2. Внести по 0,02 мл калібрувальних та ослідуваних зразків у відповідні, відібрані для аналізу лунки
3. Додати у всі лунки по 0,15 мл розчину кон'югату
4. Інкубувати стрип протягом 60 хвилин при струшуванні та температурі +37°С
5. Приготувати буфер для промивання: 5 мл концентрату внести у мірну колбу на 100 мл, дистильованою водою довести до мітки
6. Після закінчення інкубації видалити вміст лунок, промити їх приготованим буферним розчином 5 разів
7. Внести у всі лунки по 0,1 мл розчину ТМБ
8. Інкубувати при кімнатній температурі 20 хв у темному місці
9. Додати у всі лунки по 0,1 мл розчину соляної кислоти (стоп-реагент)
10. Виміряти оптичну щільність у кожній лунці на ридері при довжині хвилі 450 нм

Розрахунок

Визначення вмісту прогестерону у кожній з дослідних проб проводиться за калібрувальним графіком з використанням програми імуноферментного ридеру

МАТЕРІАЛИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. Синтез якого C₂₁-стероїдного гормону починається з гідроксилювання прогестерону по C₂₁-положенню?
 - A. Прегненолону
 - B. Тестостерону
 - C. Альдостерону
 - D. Кортизону
 - E. Кортизолу
2. Синтез якого C₂₁-стероїдного гормону починається з гідроксилювання прогестерону по C₁₇-положенню?
 - A. Прегненолону
 - B. Тестостерону
 - C. Альдостерону
 - D. Кортикостерону
 - E. Кортизолу
3. Порушення синтезу статевих гормонів виникає при генетичному дефекті:
 - A. C₁₇₋₂₀-ліази
 - B. 11-гідроксилази
 - C. 21-гідроксилази

- D. 18-гідроксилази
 - E. Всі відповіді правильні
4. Генетично детермінований дефект C₁₇₋₂₀-ліази призводить до порушення синтезу:
- A. Естріолу та тестостерону
 - B. Естрадіолу та естріолу
 - C. Тестостерону та дигідротестостерону
 - D. Естріолу, тестостерону та прогестерону
 - E. Естріолу та прогестерону
5. Гіперпродукція адренкортикотропного гормону гіпофізу не спостерігається тільки при дефекті:
- A. C₂₀₋₂₂-ліази
 - B. 11-гідроксилази
 - C. 21-гідроксилази
 - D. 18-гідроксилази
 - E. Всі відповіді правильні
6. Який з наведених ферментів не бере участь в синтезі естрогенів?
- A. C₂₀₋₂₂-ліаза
 - B. C₁₇₋₂₀-ліаза
 - C. 21-гідроксилаза
 - D. 11-гідроксилаза
 - E. 17-гідроксилаза
7. Розмістіть стероїдні гормони у порядку збільшення кількості атомів вуглецю в їх будові
- A. Альдостерон, естріол, тестостерон
 - B. Альдостерон, тестостерон, естріол
 - C. Тестостерон, естріол, альдостерон
 - D. Естріол, тестостерон, альдостерон
 - E. Тестостерон, альдостерон, естріол
8. Ліпоїдна гіперплазія кори наднирників з тотальною стероїдною недостатністю та сольтеруєчим синдромом виникає при дефекті:
- A. C₂₀₋₂₂-ліази
 - B. C₁₇₋₂₀-ліази
 - C. 21-гідроксилази
 - D. 11-гідроксилази
 - E. 18-гідроксилази
9. Гіперплазія кори наднирників з гіпертензією та вірилізацією виникає при дефекті:
- A. C₂₀₋₂₂-ліази
 - B. C₁₇₋₂₀-ліази
 - C. 21-гідроксилази
 - D. 11-гідроксилази
 - E. 18-гідроксилази

10. Вірилізація у осіб жіночої статі при вродженій дисфункції кори наднирників не виникає тільки при дефекті:

- A. 3 β -гідроксистероїддегідрогенази
- B. 11-гідроксилази
- C. 21-гідроксилази
- D. 18-гідроксилази
- E. Всі відповіді правильні

5. ЛІТЕРАТУРА (див. на стор.)

Заняття №9

ТЕМА: Біохімічні дослідження у пренатальній діагностиці

МЕТА: Розглянути біохімічні показники, що використовуються для лабораторного пренатального скринінгу

ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ ПІД ЧАС ПІДГОТОВКИ ТА

ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

- 1) Поняття пренатального скринінгу, його роль
- 2) Біохімічний скринінг першого триместру вагітності («подвійний» біохімічний тест)
- 3) Біохімічний скринінг другого триместру вагітності («потрійний» біохімічний тест)
- 4) Лабораторні тести на уроджені порушення розвитку ЦНС (α -фетопротеїн, вільний хоріонічний гонадотропін)
- 5) Особливості лабораторного дослідження та правильна інтерпретація результатів пренатального скринінгу

ПРАКТИЧНІ РОБОТИ, ЯКІ ВИКОНУЮТЬСЯ НА ЗАНЯТТІ

ПРОТОКОЛ № 9

Дата

1. Визначення рівня хоріонічного гонадотропіну у сироватці крові імуноферментним методом

Принцип методу: В наборі використовується 2 види антитіл – перше анти- β -hCG антитіло зафіксоване на твердій фазі (поверхня лунок планшету), а друге – мишаче моноклональне анти- β -hCG антитіло в розчині ензимного кон'югату. Досліджуваний зразок додається до першого антитіла, що знаходиться на дні лунок та інкубується з буферним розчином. В процесі

інкубації антиген (β -субодиниця хоріонічного гонадотропіну - β -hCG) утворює імунний комплекс з першим антитілом. На другому етапі додається друге антитіло, помічене пероксидазою хрину (кон'югат), яке зв'язується з β -субодиницею ХГ. Розвиток забарвлення відбувається під дією тетраметилбензидину (ТМБ). Концентрація β -hCG прямо пропорційна інтенсивності забарвлення у досліджуваному зразку.

Лінійність методу: 2 – 300 мОд/мл

Нормальні значення:

чоловіки та невагітні жінки	– до 5 мОд/мл
1 – 2 тиждень вагітності	25 – 300 мОд/мл
2 – 3 тиждень вагітності	1500 – 5000 мОд/мл
3 – 4 тиждень вагітності	10000 – 30000 мОд/мл
4 – 5 тиждень вагітності	20000 – 100000 мОд/мл
5 – 8 тиждень вагітності	50000 – 200000 мОд/мл
8 – 9 тиждень вагітності	20000 – 100000 мОд/мл
9 – 12 тиждень вагітності	20000 – 95000 мОд/мл
13 – 14 тиждень вагітності	15000 – 60000 мОд/мл
15 – 25 тиждень вагітності	10000 – 35000 мОд/мл
26 – 37 тиждень вагітності	10000 – 60000 мОд/мл
жінки у період менопаузи	до 9,5 мОд/мл

Концентрація хоріонічного гонадотропіну стабільна протягом 2 діб при температурі $+2 - +8^{\circ}\text{C}$, за умови, що сироватка чи плазма без слідів гемолізу.

Обладнання і реагенти:

- 1) Спектрофотометр вертикального сканування (ридер) з довжиною хвилі 450 нм
- 2) Шейкер-термостат з можливістю підтримування температури $+37^{\circ}\text{C}$
- 3) Автоматичні піпетки на 0,02; 0,1; 0,15 і 1 мл
- 4) Сироватка крові
- 5) Дистильована вода
- 6) Калібрувальні проби
- 7) Розчин нульового буферу
- 8) Кон'югат-пероксидаза
- 9) Розчин тетраметилбензидину (ТМБ)
- 10) Розчин соляної кислоти (стоп-реагент)

Проведення аналізу

1. Всі реагенти перед проведенням аналізу повинні бути доведені до кімнатної температури.
2. Внести по 0,05 мл калібрувальних та досліджуваних зразків у відповідні, відібрані для аналізу лунки
3. Додати у всі лунки по 0,10 мл нульового буферу
4. Інкубувати стрип протягом 30 хвилин при кімнатній температурі
5. Після закінчення інкубації видалити вміст лунок, промити їх дистильованою водою 5 разів

6. Додати у всі лунки по 0,15 мл розчину кон'югат-пероксидази
7. Інкубувати стрип протягом 30 хвилин при кімнатній температурі
8. Після закінчення інкубації видалити вміст лунок, промити їх дистильованою водою 5 разів
9. Внести у всі лунки по 0,10 мл розчину ТМБ
10. Інкубувати при кімнатній температурі 20 хв у темному місці
11. Додати у всі лунки по 0,10 мл розчину соляної кислоти (стоп-реагент)
12. Виміряти оптичну щільність у кожній лунці на ридері при довжині хвилі 450 нм

Розрахунок

Визначення вмісту β -субодиниці хоріонічного гонадотропіну у кожній з дослідних проб проводиться за калібрувальним графіком з використанням програми імуноферментного ридеру

2. Визначення рівня α -фетопротейну у сироватці крові імуноферментним методом

Принцип методу: твердофазний імуноферментний аналіз на основі «сендвіч»-методу.

Нормальні значення: чоловіки та невагітні жінки: <10 Од/мл

1 – 12 тиждень вагітності: <15 Од/мл

13 – 15 тиждень вагітності: 15 – 60 Од/мл

15 – 19 тиждень вагітності: 15 – 95 Од/мл

20 – 24 тиждень вагітності: 27 – 125 Од/мл

25 – 27 тиждень вагітності: 52 – 140 Од/мл

28 – 30 тиждень вагітності: 67 – 150 Од/мл

31 – 32 тиждень вагітності: 100 – 250 Од/мл

Концентрація α -фетопротейну стабільна протягом 2 діб при температурі +2 - +8⁰ С, за умови, що сироватка чи плазма без слідів гемолізу.

Обладнання і реагенти:

- 1) Спектрофотометр вертикального сканування (ридер) з довжиною хвилі 450 нм
- 2) Шейкер-термостат з можливістю підтримування температури +37⁰ С
- 3) Автоматичні піпетки на 0,02; 0,1; 0,15 і 1 мл
- 4) Сироватка крові
- 5) Дистильована вода
- 6) Калібрувальні проби
- 7) Кон'югат-пероксидаза
- 8) Розчин тетраметилбензидину (ТМБ)
- 9) Розчин соляної кислоти (стоп-реагент)

Проведення аналізу

1. Всі реагенти перед проведенням аналізу повинні бути доведені до кімнатної температури.

2. Внести по 0,025 мл калібрувальних та досліджуваних зразків у відповідні, відібрані для аналізу лунки
3. Додати у всі лунки по 0,1 мл кон'югату
4. Інкубувати стрип протягом 30 хвилин при струшуванні та температурі +37° С
5. Після закінчення інкубації видалити вміст лунок, промити їх дистильованою водою 5 разів
6. Внести у всі лунки по 0,1 мл розчину ТМБ
7. Інкубувати при кімнатній температурі 20 хв у темному місці
8. Додати у всі лунки по 0,05 мл розчину соляної кислоти (стоп-реагент)
9. Виміряти оптичну щільність у кожній лунці на ридері при довжині хвилі 450 нм

Розрахунок

Визначення вмісту α -фетопротейну у кожній з дослідних проб проводиться за калібрувальним графіком з використанням програми імуноферментного ридеру

МАТЕРІАЛИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. З якою метою проводять пренатальну діагностику?
 - A. З метою визначення строку вагітності
 - B. З метою виявлення генетичних дефектів розвитку плоду
 - C. З метою визначення статі дитини
 - D. З метою попередження ускладнень під час вагітності
 - E. Всі відповіді правильні
2. До «подвійного» біохімічного тесту відносять:
 - A. Вільна β -субодиниця ХГЛ та α -фетопротейн
 - B. Вільна β -субодиниця ХГЛ та плацентарний лактоген
 - C. Вільна β -субодиниця ХГЛ та РАРР-протеїн
 - D. РАРР-протеїн та α -фетопротейн
 - E. α -Фетопротейн та вільний естріол
3. На яких строках вагітності проводять подвійний біохімічний тест?
 - A. 5 – 7 тиждень
 - B. 7 – 9 тиждень
 - C. 10 – 13 тиждень
 - D. 13 – 15 тиждень
 - E. 17 – 20 тиждень
4. Біохімічний тест на вроджені пороки розвитку ЦНС включає визначення:
 - A. Вільна β -субодиниця ХГЛ та α -фетопротейн
 - B. Вільна β -субодиниця ХГЛ та плацентарний лактоген
 - C. Вільна β -субодиниця ХГЛ та РАРР-протеїн
 - D. РАРР-протеїн та α -фетопротейн
 - E. α -Фетопротейн та вільний естріол
5. Про наявність у плоду синдрому Дауна свідчать:

- A. Підвищення рівня РАРР-протеїну та зниження ХГЛ
 - B. Зниження рівня РАРР-протеїну та зниження ХГЛ
 - C. Зростання концентрації плацентарного лактогену та α -фетопротеїну
 - D. Підвищення рівня α -фетопротеїну та зниження ХГЛ
 - E. Зниження рівня α -фетопротеїну та підвищення ХГЛ
6. Вільний естріол у крові вагітних жінок є продуктом фетоплацентарного комплексу, утворюючись із попередника:
- A. Дегідроепіандростерон-сульфата
 - B. 16- α -гідроксидегідроепіандростерона
 - C. 17- α -етинілестрадіолу
 - D. 17- α -гідроксипрогестерону
 - E. Прегнізалону
7. Підвищення рівня α -фетопротеїну характерне для:
- A. Гідроцефалії плоду
 - B. Ліпоїдного нефрозу плоду
 - C. Дефектів розвитку нервового каналу
 - D. Тетради Фалло
 - E. Всі відповіді правильні
8. До біохімічних показників «потрійного» тесту відносять α -фетопротеїн, ХГЛ та:
- A. РАРР-білок
 - B. Плацентарний лактоген
 - C. Естрадіол
 - D. Естріол вільний
 - E. Прегнізалон
9. Підвищений рівень ХГЛ у невагітних жінок свідчить про:
- A. Хоріонкарциному
 - B. Новоутворення ШКТ
 - C. Новоутворення легень та нирок
 - D. Семіному
 - E. Всі відповіді правильні
10. Знижений рівень плацентарного лактогену у вагітних може свідчити про:
- A. Спонтанний аборт
 - B. Ризик для плоду з 30 тижня гестації
 - C. Хоріонкарциному
 - D. Міхуровий занос
 - E. Всі відповіді правильні

5. ЛІТЕРАТУРА (див. на стор. 105)

Заняття №10

ТЕМА: Біохімічні дослідження електролітного гомеостазу

МЕТА: Сформулювати уявлення про патобіохімію обміну електролітів та лабораторні методи їх вивчення

ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ ПІД ЧАС ПІДГОТОВКИ ТА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

- 1) Біологічна роль води та її розподіл в організмі людини. Водний баланс та його види
- 2) Біогенні елементи та їх фізіологічна роль (натрій, калій, кальцій, фосфор, залізо, хлор, мідь, цинк, марганець, йод)
- 3) Регуляція водно-сольового обміну
- 4) Порушення обміну найбільш важливих макроелементів у організмі людини
- 5) Алгоритм патогенетично обґрунтованої диференційної діагностики гіпонатріємії
- 6) Патогенез гіпокаліємії в результаті побічної дії діуретиків
- 7) Методи лабораторної діагностики електролітного гомеостазу

ПРАКТИЧНІ РОБОТИ, ЯКІ ВИКОНУЮТЬСЯ НА ЗАНЯТТІ

ПРОТОКОЛ № 10

Дата

1. Визначення концентрації калію в сироватці крові турбодіметричним методом без депротейнування

Принцип методу: При взаємодії іонів калія з іонами тетрафенілбората в лужному середовищі утворюється стабільна суспензія. Каламутність суспензії, виміряна при довжині хвилі 578 нм, пропорційна концентрації іонів калію в досліджуваному зразку

Лінійність методу: 1,0 – 10,0 ммоль/л

Нормальні значення: сироватка крові

Діти – 3,4 – 4,7 ммоль/л

Дорослі – 3,5 – 5,1 ммоль/л

Концентрація калію стабільна протягом 24 годин при температурі +2 - +8° С, за умови, що сироватка чи плазма відібрані не пізніше 30 хвилин після забору крові.

Обладнання і реагенти:

- 1) Спектрофотометр (фотоелектроколориметр) з довжиною хвилі 578 нм та довжиною оптичного шляху 10 або 5 мм

- 2) Автоматичні або скляні піпетки на 0,05 і 2 мл
- 3) Сироватка крові
- 4) Осаджуючий реагент
- 5) Калібратор – калібрувальний розчин калію, 5,0 ммоль/л.

Приготування робочих розчинів

Осаджуючий реагент готовий до використання. Після використання реактиву для аналізу негайно закрити флакон, щоб уникнути випаровування або контамінації реактиву. Розчин стійкий протягом місяця після розкриття упаковки при температурі від + 18⁰С до + 25⁰С в темному місці

Калібрувальний розчин калію готовий до використання. Розчин стійкий.

Проведення аналізу

Сироватка або гепаринизована плазма крові. Аналіз проводиться згідно таблиці 1.

Таблиця 1

Відміряти у пробірку:	Варіант з використанням монореагенту		
	Дослідна проба	Калібрувальна проба	Холоста проба
Осаджуючий розчин	2,0	2,0	2,0
Досліджуваний зразок	0,05	-	-
Калібрувальний розчин калію	-	0,05	-
Бідистильована вода	-	-	0,05

ВАЖЛИВО. Досліджуваний зразок додавати в осаджуючий розчин повільно, без перемішування

Час інкубації – 2 хвилини при температурі від + 18⁰С до + 25⁰С. Потім реакційну суміш інтенсивно перемішати.

Подальша інкубація – 10 хвилин при температурі від + 18⁰С до + 25⁰С.

Перед фотометруванням всі проби енергійно перемішати

Виміряти оптичну щільність дослідної ($E_{\text{дос}}$) і калібрувальної ($E_{\text{каліб}}$) проб проти холостої проби при довжині хвилі 578 нм.

Розрахунок

Вміст калію у досліджуваному матеріалі розраховують за калібровочним розчином по формулі:

$$C_{\text{дос}} \text{ (ммоль/л)} = \frac{E_{\text{дос}}}{E_{\text{каліб}}} \times C_{\text{каліб}}$$

де $C_{\text{дос}}$ – концентрація калію у досліджуваній пробі, ммоль/л;

$E_{\text{дос}}$ – оптична щільність дослідної проби;

$E_{\text{каліб}}$ – оптична щільність калібрувальної проби;

$C_{\text{каліб}}$ – концентрація калію в калібрувальному розчині (5,0 ммоль/л)

Примітки

1. Основним джерелом помилок є забруднений посуд та кювети
2. Скляний посуд та кювети, що використовуються при аналізі, повинні бути цілком чистими, спеціально підготовленими, тобто замоченими на декілька годин у HNO_3 (концентрація близько 2 моль/л), а потім ретельно промитими та висушеними.

Заповнити таблицю

№ п/п	№ зразка	Оптична щільність	Абсолютне значення, ммоль/л

Висновок:

2. Визначення концентрації натрію в сироватці крові колориметричним методом

Принцип методу: Натрій, що міститься у досліджуваному зразку, зв'язується з осаджуючим реагентом. Іони осаджуючого розчину, що залишилися, утворюють забарвлений комплекс з тіогликолятом. Концентрація натрію пропорційна різниці між контрольною (без преципітації) та дослідною пробами

Лінійність методу: 1,0 – 250 ммоль/л

Нормальні значення: сироватка крові

Діти – ммоль/л

Дорослі – ммоль/л

Концентрація натрію стабільна протягом 24 годин при температурі $+2 - +8^\circ \text{C}$, за умови, що сироватка чи плазма відібрані не пізніше 30 хвилин після забору крові.

Обладнання і реагенти:

- 1) Спектрофотометр (фотоелектроколориметр) з довжиною хвилі 365 нм та довжиною оптичного шляху 10 або 5 мм
- 2) Автоматичні або скляні піпетки на 0,04 і 2 мл
- 3) Сироватка крові
- 4) Реагент 1 - осаджуючий розчин (0,1 М оцтова кислота, 15,2 М етиловий спирт, 140 мМ ацетат магнію)

- 5) Реагент 2 – 550 мМ тіогликолят амонію
 6) Калібратор – калібрувальний розчин натрію, 150,0 ммоль/л.

Приготування робочих розчинів

Реагенти 1 та 2 готові до використання, стійкі

Калібрувальний розчин натрію готовий до використання. Розчин стійкий.

Проведення аналізу

Сироватка або гепаринизована плазма крові. Аналіз проводиться згідно таблиці 1.

Таблиця 1

Відміряти у пробірку:	Варіант з використанням монореагенту		
	Дослідна проба	Калібрувальна проба	Контрольна проба
Реагент 1 (осаджуючий розчин)	1,0	1,0	1,0
Досліджуваний зразок	0,02	-	-
Калібрувальний розчин	-	0,02	-
Бідистильована вода	-	-	0,02

Зразки ретельно перемішати та інкубувати 5 хвилин при температурі від + 18⁰С до + 25⁰С, потім знову перемішати (не менше 30 сек) та витримати ще 30 хвилин у темноті. Всі проби з реакційною сумішшю центрифугувати 10 хвилин при 1000 об/хв. Для подальшого аналізу використовувати прозору надосадкову рідину (супернатант). Для цього змішати 0,02 мл супернатанту дослідної, калібрувальної та холостої проб з 2 мл реагенту 2 та через 5 хвилин виміряти оптичну щільність дослідної, калібрувальної та контрольної проб проти води при довжині хвилі 365 нм. Забарвлення стабільне протягом 25 хвилин після закінчення інкубації за умови відсутності прямих сонячних променів.

ВАЖЛИВО. Інтенсивність забарвлення зразків обернено пропорційна концентрації натрію у досліджуваному зразку

Розрахунок

Вміст натрію у досліджуваному матеріалі розраховують по формулі:

$$C_{\text{дос}} (\text{ммоль/л}) = \frac{E_{\text{контр}} - E_{\text{досл}}}{E_{\text{контр}} - E_{\text{каліб}}} \times C_{\text{каліб}}$$

де $C_{\text{дос}}$ – концентрація натрію у досліджуваній пробі, ммоль/л;

$E_{\text{дос}}$ – оптична щільність дослідної проби;

$E_{\text{каліб}}$ – оптична щільність калібрувальної проби;

$C_{\text{каліб}}$ – концентрація натрію в калібрувальному розчині (150,0 ммоль/л)

Заповнити таблицю

№ п/п	№ зразка	Оптична щільність	Абсолютне значення, ммоль/л

Висновок:

3. Фотометричне визначення загального кальцію у біологічних рідинах

Принцип методу: Іони кальцію в лужному середовищі реагують у лужному середовищі з о-крезолфталейновим комплексом і утворюють кольоровий комплекс. Інтенсивність забарвлення комплексу фіолетового кольору пропорційна концентрації кальцію в дослідній пробі

Лінійність методу: 0,125 – 4,0 ммоль/л

Нормальні значення: сироватка крові

Діти – 2,20 – 2,70 ммоль/л

Дорослі – 2,15 – 2,50 ммоль/л

Концентрація кальцію стабільна протягом 24 годин при температурі +2 - +8° С, за умови, що сироватка чи плазма відібрані не пізніше 30 хвилин після забору крові.

Обладнання і реagenти:

- 1) Спектрофотометр (фотоелектроколориметр) з довжиною хвилі 570 нм та довжиною оптичного шляху 10 або 5 мм
- 2) Автоматичні або скляні піпетки на 0,05 і 2 мл
- 3) Сироватка крові
- 4) Хромоген (0,12 мМ о-крезолфталейновий комплексон, 16 мМ 8-оксихінолін)
- 5) Буферний розчин (0,8 М моноетаноламін)
- 6) Калібратор – калібрувальний розчин кальцію, 2,5 ммоль/л.

Приготування робочих розчинів

Хромоген, буферний та калібрувальний розчини готові до використання, стійкі

Досліджувані зразки

Сироватка. Брати кров при мінімальному стискуванні вени, без напруження м'язів

Плазма. Як антикоагулянт необхідно використовувати тільки гепарин. Інші речовини, такі як ЕДТА, оксалат, фторид, цитрат заважають визначенню кальцію.

Добова сеча. Сечу збирати в ємність, що містить 10 мл НСІ (6 моль/л) або підкислити після збору до рН < 2,0 для розчинення солей кальцію

Проведення аналізу

Аналіз проводиться згідно таблиці 1.

Таблиця 1

Відміряти у пробірку:	Варіант з використанням монореагенту		
	Дослідна проба	Калібрувальна проба	Холоста проба
Хромоген	1,0	1,0	1,0
Досліджуваний зразок	0,02	-	-
Калібрувальний розчин	-	0,02	-
Буферний розчин	1,0	1,0	1,0
Дистильована вода	-	-	0,02

Зразки ретельно перемішати та інкубувати 10 хвилин при температурі від + 18⁰С до + 25⁰С. Виміряти оптичну щільність дослідної та калібрувальної проби проти холостої при довжині хвилі 570 нм. Забарвлення стабільне протягом 30 хвилин.

Розрахунок

Вміст натрію у досліджуваному матеріалі розраховують по формулі:

$$C_{\text{дос}} \text{ (ммоль/л)} = \frac{E_{\text{досл}}}{E_{\text{каліб}}} \times C_{\text{каліб}}$$

де $C_{\text{дос}}$ – концентрація кальцію у досліджуваній пробі, ммоль/л;

$E_{\text{дос}}$ – оптична щільність дослідної проби;

$E_{\text{каліб}}$ – оптична щільність калібрувальної проби;

$C_{\text{каліб}}$ – концентрація кальцію в калібрувальному розчині (2,5 ммоль/л)

Для розрахунку концентрації кальцію у добовій сечі отримане вище значення помножити на об'єм доборої сечі, виражений в літрах та на коефіцієнт 10 (для отримання результатів в мг/добу)

Клініко-діагностичне значення.

Заповнити таблицю

№ п/п	№ зразка	Оптична щільність	Абсолютне значення, ммоль/л

Висновок:

4. Визначення концентрації заліза та загальної залізо зв'язуючої здатності сироватки крові

Обладнання і реagenти:

- 1) Спектрофотометр (фотоелектроколориметр) з довжиною хвилі 562 нм та довжиною оптичного шляху 10 або 5 мм
- 2) Центрифуга для пробірок
- 3) Автоматичні або скляні піпетки на 0,1, 1,0 та 5,0 мл
- 4) Сироватка крові
- 5) Фізіологічний розчин
- 6) Буферний розчин
- 7) Розчин феррозину (20 г/л)
- 8) Стандартний розчин заліза (20 мкмоль/л)
- 9) Насичуючий розчин заліза
- 10) Сорбент (лужний карбонат магнію)

Зразки для аналізу

Сироватка або гепаринізована плазма

Не застосовувати ЕДТА, оксалатну та цитратну плазму. Не використовувати для аналізу мутну (ліпемічну) чи гемолітичну сироватку – можливо отримання завищених результатів. Концентрація заліза стабільна протягом 4 діб при кімнатній температурі.

Приготування робочих розчинів

Розчини готові та придатні до використання після відкупорювання флаконів протягом місяця при зберіганні від +2 до +8⁰С.

Визначення концентрації заліза в сироватці крові

Принцип методу: залізо звільняється з залізо зв'язуючих пептидів сироватки крові та відновлюється завдяки дії гуанідину та гідроксиламіну. Феррозин дає з іонами заліза Fe⁺² комплекс фіолетового кольору. Оптична щільність дослідного розчину пропорційна концентрації заліза в пробі.

Лінійність методу: 4 – 200 мкмоль/л

Нормальні значення: сироватка крові

Чоловіки – 9,5 – 29,9 мкмоль/л

Жінки – 8,8 – 27,0 мкмоль/л

Проведення аналізу

Аналіз проводиться згідно таблиці 1.

Таблиця 1

Відміряти у пробірці:	Дослідна проба	Калібрувальна проба	Холоста проба
Буферний розчин	2,0 мл	2,0 мл	2,0 мл
Сироватка крові	0,5 мл		
Стандартний розчин		0,5 мл	
Деіонізована вода			0,5 мл
Витримати 5 – 10 хв. при кімнатній температурі, виміряти оптичну щільність дослідної ($E_{\text{дос1}}$) і калібрувальної ($E_{\text{каліб1}}$) проб проти холостої проби при довжині хвилі 562 нм.			
Розчин феррозину	0,04 мл	0,04 мл	0,04 мл

Ретельно перемішати вміст пробірок та інкубувати при температурі 25°C протягом 15 – 20 хвилин. Виміряти оптичну щільність дослідної ($E_{\text{дос2}}$) і стандартної ($E_{\text{каліб2}}$) проб проти холостої проби при довжині хвилі 562 нм. Забарвлення розчину стабільне протягом 30 хвилин.

Розрахунок

Вміст заліза у досліджуваному матеріалі розраховують за стандартом по формулі:

$$C_{\text{дос}} \text{ (мкмоль/л)} = \frac{E_{\text{дос2}} - E_{\text{дос1}}}{E_{\text{каліб2}} - E_{\text{каліб1}}} \times C_{\text{каліб}} \quad (1)$$

де $C_{\text{дос}}$ – концентрація заліза у досліджуваній пробі, мкмоль/л;

$E_{\text{дос1}}, E_{\text{дос2}}$ – оптична щільність дослідної проби;

$E_{\text{каліб1}}, E_{\text{каліб2}}$ – оптична щільність стандартної проби;

$C_{\text{каліб}}$ – концентрація заліза в стандартному розчині, мкмоль/л

Заповнити таблицю

№ п/п	№ зразка	Оптична щільність		Абсолютне значення, мкмоль/л
		E 1	E 2	

Висновок:

Визначення загальної залізовв'язуючої здатності сироватки крові

Принцип методу: Трансферин в непатологічних сироватках зв'язує іони заліза до 1/3 свого об'єму. Для насичення трансферину сироватку обробляють надлишковою кількістю іонів заліза Fe^{+3} . Від незв'язаних іонів заліза розчин звільняють за допомогою карбонату магнію. Визначаючи концентрацію заліза в насиченій сироватці, знаходять її загальну залізовв'язуючу здатність (ЗЗЗЗ). Різниця між ЗЗЗЗ та залізом сироватки крові – це ненасичена залізовв'язуюча здатність (НЗЗЗ).

ЗЗЗЗ = концентрація заліза у сироватці + НЗЗЗ

Нормальні значення ЗЗЗЗ: 44,8 – 76,1 мкмоль/л

НЗЗЗ: 32 – 46 мкмоль/л

Насичення трансферину: чоловіки – 20 – 50%

жінки – 15 – 50%

Проведення аналізу

Аналіз проводиться згідно таблиці 2.

Таблиця 2

Відміряти у пробірку:	Дослідна проба
Насичуючий розчин заліза	1,0 мл
Сироватка крові	0,5 мл
Перемішати вміст пробірок та витримати їх 5 – 6 хвилин при кімнатній температурі	
Сорбент	0,1 – 0,2 г (близько 0,5 мл)
Витримати 5 – 10 хв. при кімнатній температурі, перемішуючи кожні 2 – 3 хв. Центрифугувати 15 хв. при 1500 об/хв. та провести визначення концентрації заліза згідно таблиці 1, використовуючи замість сироватки надосадкову рідину	

Розрахунок

Концентрацію заліза у надосадковій рідині, знайдену згідно формули 1, необхідно помножити на коефіцієнт розведення – 3. отриманий результат означає ЗЗЗЗ. Для розрахунку НЗЗЗ із знайденого значення ЗЗЗЗ вилучають концентрацію заліза в сироватці крові.

$$\% \text{ насичення трансферину} = \frac{\text{Залізо сироватки} \times 100}{3333} \quad (2)$$

Заповнити таблицю

№ п/п	№ зразка	Оптична щільність		Абсолютне значення		
		Е 1	Е 2	ЗЗЗЗ	НЗЗЗ	% насичення трансферину

Висновок:

МАТЕРІАЛИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

- До лікаря звернувся хворий, який упродовж тривалого часу вживав лікарський засіб спіронолактон (антагоніст альдостерону) у зв'язку з тахікардією й гіпертензією. Причиною такого стану може бути:
 - Гіпонатріємія
 - Гіпернатріємія
 - Гіпокальціємія
 - Гіпокаліємія
 - Гіперкаліємія
- Госпіталізовано хворого, у якого виявлено гіпотензію, порушення свідомості, сухість слизових оболонок. Причиною такого стану може бути:
 - Гіперкаліємія
 - Гіпернатріємія
 - Гіпонатріємія
 - Гіперкупріємія
 - Гіпокупріємія
- У хворого, який тривалий час вживає тіазидні діуретики, може виникнути:
 - Гіперкальціємія
 - Гіпокальціємія
 - Гіпокаліємія

- D. Гіперкаліємія
 - E. Гіпомагніємія
4. Хворому, в якого виявлено клінічні ознаки, пов'язані з гіпернатріємією (підвищений венозний тиск, набряк легень), потрібно здійснити корекцію шляхом введення:
- A. Калію
 - B. Кальцію
 - C. Вітамінів
 - D. Води
 - E. Міді
5. До лікаря звернувся хворий, який вживав у надлишковій кількості печінку риби, зі скаргами на підвищений тиск. Рентгенологічне дослідження підтвердило відкладання каменів у сечових шляхах. Причиною такого стану може бути:
- A. Гіперкупріємія
 - B. Гіперкальціємія
 - C. Гіпокальціємія
 - D. Гіперфосфатемія
 - E. Гіперкаліємія
6. До приймального відділення із м'язовою слабкістю та ознаками порушення з боку серця доставлено хворого з попереднім діагнозом гіперкаліємія. Який із лікарських засобів доцільно застосувати?
- A. Глюконат кальцію
 - B. Гідрохлорид натрію
 - C. Глюкозу
 - D. Гіпотіазид
 - E. Гістамін
7. У жінки віком 80 років, яка не отримувала адекватної кількості пиття, спостерігається підвищення венозного тиску, набряк легень. Причиною такого стану може бути:
- A. Гіпокальціємія
 - B. Гіперкаліємія
 - C. Гіпокаліємія
 - D. Гіпонатріємія
 - E. Гіпернатріємія
8. Людина, яка прибуває в дуже жаркі кліматичні умови, впродовж перших днів втрачає значну кількість натрію з потом. Ці втрати зазвичай компенсуються вживанням значної кількості вільних від натрію рідин, результатом чого може бути:
- A. Гіпернатріємія
 - B. Гіпонатріємія
 - C. Гіперкаліємія
 - D. Гіпокаліємія
 - E. Гіпокальціємія

9. Хворий, який упродовж тривалого часу вживав тiazидні діуретики, скаржиться на загальну слабкість, втрату апетиту, серцебиття, спостерігається гіпотонія м'язів. Причиною такого стану може бути:

- A. Гіпернатріємія
- B. Гіпонатріємія
- C. Гіперкаліємія
- D. Гіпокаліємія
- E. Гіпокальціємія

10. У хворого віком 20 років з неврологічними порушеннями виявлено патологію печінки та нирок. Концентрація міді в сироватці крові низька, екскреція з сечею – висока. Яке з нижчеперелічених захворювань найбільш ймовірне?

- A. Хвороба Жильбера
- B. Синдром Іценко-Кушинга
- C. Хвороба Аддісона
- D. Хвороба Коновалова – Вільсона
- E. Хвороба Дауна

5. ЛІТЕРАТУРА (див. на стор. 105)

Заняття №11

ТЕМА: Біохімічні дослідження порушення кислотно-лужної рівноваги (семінар)

МЕТА: Сформулювати уявлення про патобіохімію КЛР та лабораторні методи її вивчення

ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ ПІД ЧАС ПІДГОТОВКИ ТА

ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

- 1) Загальне поняття про кислотно-лужний стан
- 2) Буферні системи крові
- 3) Регуляція кислотно-лужної рівноваги
- 4) Порушення кислотно-лужного стану – алкалози та ацидоз
- 5) Метаболічний ацидоз
- 6) Респіраторний ацидоз
- 7) Метаболічний алкалоз
- 8) Респіраторний алкалоз

9) Лабораторні методи та особливості дослідження кислотно-лужного стану

Теми рефератів:

1. Лабораторна діагностика кислотно-лужного стану

МАТЕРІАЛИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. Які з перелічених показників КЛС є чисто респіраторними?
 - A. рН, актуальний гідрокарбонат, загальна CO_2
 - B. Буферні основи
 - C. Стандартний гідрокарбонат
 - D. Зсув буферних основ
 - E. pCO_2
2. Які з перелічених показників КЛС є змішаними - відображають респіраторні і метаболічні порушення?
 - A. рН, актуальний гідрокарбонат, загальна CO_2
 - B. Буферні основи
 - C. Зсув буферних основ (BE, BD)
 - D. Стандартний гідрокарбонат
 - E. pCO_2
3. Як змінюється концентрація в крові основних аніонів, катіонів при метаболічному ацидозі?
 - A. Не змінюється
 - B. Зменшується концентрація хлору, залишкових аніонів (SO_4 , HPO_4), збільшується гідрокарбонат натрію
 - C. Збільшується концентрація калію, хлору або залишкових аніонів, зменшується гідрокарбонат натрію
 - D. Зменшується концентрація калію, хлору або залишкових аніонів, гідрокарбонат натрію
 - E. Зменшується концентрація калію, хлору або залишкових аніонів, концентрація гідрокарбонату натрію залишається без змін
4. Які з перелічених станів викликають респіраторний ацидоз?
 - A. Зменшення хвилиного об'єму дихання
 - B. Порушення дихання, асфіксія, пригнічення дихання
 - C. Порушення дифузії газів через альвеолярну мембрану
 - D. Підвищення CO_2 у навколишньому середовищі, несправність наркозної і дихальної апаратури
 - E. Всі відповіді правильні
5. Який вид порушення КЛС розвивається у хворих у стані астматичного статусу?
 - A. Респіраторний алкалоз
 - B. Метаболічний алкалоз
 - C. Респіраторний ацидоз

- D. Метаболічний ацидоз
 - E. Респіраторний і метаболічний ацидоз
6. Яка причина розвитку респіраторного алкалозу?
- A. Збільшення об'єму легеневої вентиляції
 - B. Порушення дихального центру
 - C. Пропасні стани
 - D. Загальне перегрівання
 - E. Цукровий діабет
7. Які зміни кислотно-лужної рівноваги крові, як правило спостерігаються при тривалій блювоті?
- A. Метаболічний ацидоз
 - B. Метаболічний алкалоз
 - C. Респіраторний ацидоз
 - D. Респіраторний алкалоз
 - E. Видільний гіпохлоремічний алкалоз
8. При яких захворюваннях розвивається респіраторний алкалоз?
- A. Стеноз пілоруса
 - B. Менінгоенцефаліти, що супроводжуються тахіпноє
 - C. Пневмонії
 - D. Перитоніт
 - E. Всі відповіді правильні
9. Які показники з названих достатньо визначити, щоб оцінити кислотно-лужний стан?
- A. рН
 - B. рН і рСО₂
 - C. рН і НСО₃
 - D. рН крові, гідрокарбонат і рСО₂
 - E. Загальну буферну ємність
10. При яких захворюваннях спостерігається метаболічний ацидоз?
- A. Бронхіт
 - B. Астматичний статус
 - C. Емфізема легень
 - D. Серцево-судинна недостатність
 - E. Всі відповіді правильні

5. ЛІТЕРАТУРА (див. на стор. 105)

Заняття №12

ТЕМА: Лабораторна діагностика захворювань печінки

МЕТА: Розглянути біохімічні показники, що використовуються для лабораторного діагностики патології печінки

ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ ПІД ЧАС ПІДГОТОВКИ ТА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

- 1) Порушення вуглеводного, ліпідного, білкового, пігментного та інших обмінів печінки
- 2) Біохімічні синдроми при дослідженні процесів обміну у печінці
- 3) Механізми вірусного, алкогольного і токсичного ураження гепатоцитів
- 4) Жирова дегенерація печінки та її лабораторна діагностика
- 5) Лабораторні дослідження при гепатитах
- 6) Біохімічні основи розвитку жовчокам'яної хвороби
- 7) Ферменти гепатоцитів, активність яких визначають у сироватці крові з діагностичною метою
- 8) Алгоритм лабораторної диференційної діагностики жовтяниць

ПРАКТИЧНІ РОБОТИ, ЯКІ ВИКОНУЮТЬСЯ НА ЗАНЯТТІ

ПРОТОКОЛ № 12

Дата

1. 1. Визначення активності аланінамінотрансферази уніфікованим динітрофенілгідразиновим методом Райтмана-Френкеля

Принцип методу: Внаслідок амінування 2-оксоглутарової кислоти L-аланіном, яке відбувається під дією аланін амінотрансферази, утворюється L-глутамінова та піровиноградна кислоти. Визначення базується на вимірюванні оптичної щільності 2,4-динітрофенілгідразонів 2-оксоглутарової та піровиноградної кислот в лужному середовищі. Оскільки гідразон піровиноградної кислоти має більш високий коефіцієнт молярної екстинції, то виявляється прямопропорційна залежність оптичної щільності реакційного розчину від активності ферменту.

Лінійність методу: 0,1 – 2,5 мкмоль/год*мл (0,028 – 0,7 мккат/л)

Нормальні значення: 0,1 – 0,68 мкмоль/год*мл (0,06 – 0,14 мккат/л)

Активність ферменту стабільна протягом 5 годин при температурі +2 - +8⁰ С, за умови, що сироватка чи плазма відібрані не пізніше 30 хвилин після забору крові.

Обладнання і реagenти:

- 1) Спектрофотометр (фотоелектроколориметр) з довжиною хвилі 515 нм та довжиною оптичного шляху 10 або 5 мм

- 2) Водяний термостат або автоматична водяна баня, які здатні підтримувати температуру (плюс 37 ± 1)⁰С.
- 3) Автоматичні або скляні піпетки на 0,1, 1 і 5 мл
- 4) Мірна колба місткістю 500 мл
- 5) Сироватка крові
- 6) Фізіологічний розчин
- 7) Субстратно-буферний розчин АлАТ
- 8) Калібрувальний розчин піровинограднокислого натрію
- 9) Стоп-реагент
- 10) Розчин гідроксиду натрію

Приготування робочих розчинів

Розчин гідроксиду натрію. Вміст флакону з гідроксидом натрію кількісно перенести до мірної колби місткістю 500 мл, довести розчин до мітки дистильованою водою. Готовий розчин стабільний.

Калібрувальний розчин. Придатний до використання, після відкриття дозволяється його зберігання при кімнатній температурі протягом 12 годин.

Субстратно-буферний розчин та стоп-реагент готові до використання.

Проведення аналізу

Аналіз проводиться згідно таблиці 1.

Таблиця 1

Відміряти у пробірку, мл:	Дослідна проба	Холоста проба
Субстратно-буферний розчин	0,4	0,4
Інкубувати 3 хв при +37 ⁰ С		
Стоп реагент	-	0,4
Сироватка крові	0,08	0,08
Інкубувати 60 хв при +37 ⁰ С		
Стоп реагент	0,4	-
Витримати 20 хв при кімнатній температурі		
Розчин гідроксиду натрію	4,0	4,0

Ретельно перемішати вміст пробірок та інкубувати при температурі 25⁰С протягом 20 хвилин. Виміряти оптичну щільність дослідної ($E_{\text{дос}}$) проби проти холостої проби при довжині хвилі 515 нм.

Забарвлення розчину стабільне протягом 60 хвилин.

Розрахунок

Розрахунок активності фермента в сироватці крові проводять по калібрувочному графіку

Побудування калібрувального графіку

Таблиця 2

Відміряти у пробірку, мл	Калібрувальні точки						Контрольна проба	
	1	2	3	4	5	6		
Субстратно-буферний розчин	0,475	0,45	0,40	0,35	0,3	0,25	0,5	
Калібрувальний розчин	0,025	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	-	
Фізіологічний розчин	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	
Стоп реагент	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	
Витримати 20 хв при кімнатній температурі								
Розчин гідроксиду натрію	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	
Витримати 10 хв при кімнатній температурі. Виміряти оптичну щільність калібрувальних проб проти контрольної. Забарвлення стабільне протягом 60 хв.								
Активність АЛАТ	мкмоль/год*мл	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	0,0
	мккат/л	0,139	0,278	0,556	0,833	1,11	1,39	0,0

При побудові калібрувального графіку на осі абсцис відкладаються величини активності АЛАТ, по осі ординат – відповідні оптичні щільності. Лінійність калібрувального графіку повинна зберігатися до величини екстинції 0,25.

Побудувати калібрувальний графік

№ калібрувальної точки	Активність АЛАТ		Оптична щільність, од	Коефіцієнт пропорційності
	мкмоль/год*мл	мккат/л		
1	0,5	0,139		
2	1,0	0,278		
3	2,0	0,556		
4	3,0	0,833		
5	4,0	1,11		
6	5,0	1,39		
К				

Заповнити таблицю

№ п/п	№ зразка	Оптична щільність	Абсолютне значення,

Висновок:

2. Визначення вмісту загального та прямого білірубіну у сироватці крові за методом Ендрашика

Принцип методу: В присутності кофеїнового реактиву діазотована сульфанілова кислота утворює з прямим та зв'язаним (непрямим) білірубіном азобілірубін рожево-фіолетового кольору. Інтенсивність забарвлення дослідного розчину прямопропорційна концентрації загального білірубіну у пробі. У відсутності кофеїнового реактиву до реакції вступає лише прямий білірубін. По різниці між загальним та прямим білірубіном визначають концентрацію непрямого білірубіну.

Лінійність методу: 3,4 – 240 мкмоль/л

Нормальні значення: загальний білірубін – 8,6 – 25,5 мкмоль/л
прямий білірубін – 0,9 – 4,3 мкмоль/л

Концентрація білірубіну стабільна протягом 24 годин при температурі +2 - +8⁰ С у темному місці, за умови, що сироватка чи плазма відібрані не пізніше 30 хвилин після забору крові.

Обладнання і реagenти:

- 1) Спектрофотометр (фотоелектроколориметр) з довжиною хвилі 540 нм та довжиною оптичного шляху 10 або 5 мм
- 2) Автоматичні або скляні піпетки на 1 і 2 мл
- 3) Колба об'ємом 200 мл

- 4) Сироватка крові
- 5) Фізіологічний розчин
- 6) Кофеїновий розчин (концентрат)
- 7) Розчин сульфанілової кислоти
- 8) Розчин нітриту натрію

Приготування робочих розчинів

Кофеїновий реактив. В колбу ємністю 200 мл перенести вміст флаконів з концентрованим розчином кофеїнового реактиву, додати дистильованої води до мітки. Готовий розчин стабільний не менше місяця при температурі $+2 - +8^{\circ}\text{C}$.

Діазосуміш. Безпосередньо перед роботою змішують необхідну кількість розчину сульфанілової кислоти та розчину нітриту у співвідношенні 100:3. Розчин не стійкий.

Проведення аналізу

Сироватка або плазма крові, сеча. Аналіз проводиться згідно таблиці 1.

Таблиця 1

Відміряти у пробірку, мл:	Варіант з використанням монореагенту		
	Загальний білірубін	Прямий білірубін	Холоста проба
Досліджуваний матеріал	0,5	0,5	0,5
Кофеїновий реактив	1,75	--	1,75
Фіз. розчин	--	1,75	0,25
Діазосуміш	0,25	0,25	--

Для визначення прямого білірубину фотометрування слід проводити через 5 – 10 хв. після додавання діазосуміші, так як при довгочасній дії до реакції вступає зв'язаний (непрямий) білірубін.

Для визначення загального білірубину пробу для розвинення забарвлення витримують 20 хв., після чого фотометрують. При подальшій експозиції забарвлення не змінюється. Вимірювання оптичної щільності дослідних проб проводять проти холостої проби при довжині хвилі 540 нм та довжині оптичного шляху 5 мм

Розрахунок

Розрахунок концентрації білірубину проводять по калібрувальному графіку. Для визначення концентрації непрямих білірубину з величини загального білірубину віднімають величину показника прямого білірубину.

Калібрувальні розчини готують використовуючи набір реактивів «Білірубін калібратор».

При вмісті білірубину в пробі понад 240 мкмоль/л (поза зоною лінійності методу), аналізовану рідину слід розвести фізіологічним розчином і повторити вимірювання, а отриманий результат розрахунку помножити на коефіцієнт розведення

Заповнити таблицю

№ п/п	№ зразка	Оптична щільність		Абсолютне значення, мкмоль/л	
		E1	E2	Загальний білірубін	Прямий білірубін

Висновок:

3. Визначення співвідношення білкових фракцій сироватки крові експрес-методом

Принцип методу. Метод заснований на тому, що фосфатні розчини визначеної концентрації осаджують різні білкові фракції сироватки крові з утворенням дуже дрібної суспензії. За ступенем каламутності розчинів роблять висновок про співвідношення білків у досліджуваному матеріалі.

Обладнання і реагенти:

1. Спектрофотометр (фотоелектроколориметр), з довжиною хвилі 640 нм, довжина оптичного шляху 1,0 см
2. Автоматичні або скляні піпетки на 1, 5 і 10 мл
3. Пробірки місткістю 20 мл
4. Основний фосфатний буфер «0» - 3,347 М

5. Фосфатний буфер №1 – 3,084 М
6. Фосфатний буфер №2 – 2,496 М
7. Фосфатний буфер №3 – 2,359 М
8. Фосфатний буфер №4 – 1,959 М
9. Фосфатний буфер №5 – 1,622 М

Проведення аналізу

У штатив поміщають 7 пробірок (об'ємом 10 мл), позначених цифрами «0», «1», «2», «3», «4», «5», «6». У «0» пробірку відміряють 10 мл дистильованої води, у інші – по 5 мл відповідних фосфатних буферів. У «6»-ту пробірку вносять 0,5 мл сироватки, 0,75 мл дистильованої води і 3,75 мл розчину основного фосфатного буферу «0». Вміст пробірки змішують 5-6-кратним перевертанням її, уникаючи при цьому утворення бульбашок повітря. Потім у «1», «2», «3», «4», «5»-ту пробірки переносять по 0,5 мл отриманої суміші з пробірки «6», а в «0» - 1 мл її. Вміст кожної пробірки обережно перемішують і через 15 хвилин вимірюють оптичну щільність «1», «2», «3», «4», «5»-тої пробірок проти «0».

Примітка: безпосередньо перед фотометруванням вміст кожної пробірки необхідно ще раз ретельно перемішати, обережно підіймаючи з дна осад, уникаючи при цьому утворення бульбашок повітря.

Розрахунок.

1. Обчислюють показник оптичної щільності (E) для альбумінів. Для цього з показника (E) «1» проби віднімають показник «2» проби.
2. Обчислюють показник оптичної щільності (E) для α_1 -глобулінів. Для цього з показника (E) «2» проби віднімають показник «3» проби.
3. Обчислюють показник оптичної щільності (E) для α_2 -глобулінів. Для цього з показника (E) «3» проби віднімають показник «4» проби.
4. Обчислюють показник оптичної щільності (E) для β -глобулінів. Для цього з показника (E) «4» проби віднімають показник «5» проби.
5. Показник «5» проби є показником γ -глобулінів.

б. Обчислюють співвідношення кожної фракції у відносних або в абсолютних значеннях.

ЗАВДАННЯ

Визначити вміст білкових фракцій у запропонованому біологічному матеріалі. Дані занести в таблицю та надати клінічну інтерпретацію.

<i>Білкові фракції</i>	<i>Досліджувана проба №1</i>		<i>Досліджувана проба №2</i>	
	<i>Вміст в %</i>	<i>Вміст в г/л</i>	<i>Вміст в %</i>	<i>Вміст в г/л</i>
1. альбумін				
2. α₁-глобуліни				
3. α₂-глобуліни				
4. β-глобуліни				
5. γ-глобуліни				
Вміст загального білку				

$$\text{Альбумін} = (E_1 - E_2) \times 100$$

$$\alpha_1\text{-глобуліни} = (E_2 - E_3) \times 100$$

$$\alpha_2\text{-глобуліни} = (E_3 - E_4) \times 100$$

$$\beta\text{-глобуліни} = (E_4 - E_5) \times 100$$

$$\gamma\text{-глобуліни} = E_5 \times 100$$

Висновок:

4. Проведення тимолової проби з сироваткою крові

Принцип методу: Патологічно високі β-глобуліни та ліпопротеїни осаджуються з сироватки крові при рН 7,55 буферним розчином з великим вмістом тимолу. Вимірюють інтенсивність помутніння, яка залежить від вмісту білкових фракцій та їх кількісного співвідношення

Лінійність методу: 0 – 20 одиниць помутніння (Sh)

Нормальні значення: 0 – 4 одиниці Sh

Обладнання і реagenти:

- 1) Спектрофотометр (фотоелектроколориметр) з довжиною хвилі 630 - 690 нм та довжиною оптичного шляху 10 або 5 м
- 2) Скляні піпетки на 0,1, 5 і 20 мл
- 3) Колба місткістю 1000, 250, 100 та 50 мл
- 4) Сироватка крові
- 5) Фізіологічний розчин
- 6) Тимоловий реактив
- 7) Розчин порівняння 1
- 8) Розчин порівняння 2

Приготування робочих розчинів

Тимоловий реактив. До термостійкої колби місткістю 1000 мл наливають 900 мл дистильованої води, доводять до кипіння, опускають носик піпетки у воду та при постійному перемішуванні вносять 15 мл тимолового реагенту. Розчин охолоджують, доводять до мітки дистильованою водою та перемішують ще 10 хв.

Розчин порівняння 1. До мірної колби місткістю 250 мл піпеткою відміряють 10 мл концентрату розчину порівняння 1 та доливають охолодженою дистильованою водою до мітки та перемішують.

Розчин порівняння 2. До мірної колби місткістю 50 мл піпеткою додають 1,5 мл розчину хлориду барію та доливають до мітки охолодженим розчином порівняння 1. Вміст колби ретельно перемішують

Проведення аналізу

До пробірки відміряють піпеткою 4,8 мл тимолового реактиву, додають 0,08 мл сироватки, перемішують, витримують 30 хвилин, фотометрують проти тимолового реактиву. Ступінь помутніння знаходять за калібрувальним графіком.

Побудова калібрувального графіку

З розчинів порівняння 1 і 2 готують ряд розведень за таблицею 1, які відповідають 1 – 15 одиницям помутніння Sh

Таблиця 2

№ пробірки	1	2	3	4	5	6	7
Розчин порівняння 1, мл	5,7	5,4	5,1	4,8	4,5	3,0	1,5
Розчин порівняння 2, мл	0,3	0,6	0,9	1,2	1,5	3,0	4,5
Одиниць помутніння Sh	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	10,0	15,0

МАТЕРІАЛИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. Пенсіонер звернувся до лікаря зі скаргами на біль у правому підребер'ї. За останній тиждень спостерігається сеча темного кольору, а калові маси знебарвлені. У пацієнта порушена екскреторна функція печінки. Серед наведених тестів виберіть такий, що характеризує цю функцію:
 - A. Активність АЛАТ
 - B. Активність лужної фосфатази
 - C. Білірубін крові та сечі
 - D. Активність холінестерази крові
 - E. Тимолова проба
2. хворому на жовтяницю проведено пробу Квіка. При оральному одноразовому вживанні 4 г натрію бензоату кількість гіпурової кислоти, виведеної з сечею становить 0,5 г, при нормі 2,0 – 2,5 г. Про порушення якого біохімічного процесу свідчать отримані дані?
 - A. I фаза детоксикації (окисні реакції)
 - B. Кон'югація білірубину
 - C. Синтез жовчних кислот
 - D. Синтез альбуміну
 - E. II фаза детоксикації (кон'югаційні реакції)
3. У хворого з жовтяницею встановлено: підвищення у плазмі крові вмісту загального білірубину за рахунок непрямого (вільного), у калі й сечі – високий вміст стеркобіліну, рівень прямого (зв'язаного) білірубину в плазмі крові в межах норми. Який вид жовтяниці можна передбачити?
 - A. Фізіологічна
 - B. Паренхіматозна
 - C. Обтураційна
 - D. Гемолітична
 - E. Хвороба Жильбера
4. Жінку середніх років госпіталізовано з жовтяницею, сонливістю та клінічними ознаками хронічного захворювання печінки. Єдиним значно вираженим біохімічним відхиленням від норми була висока активність γ -глутамілтранспептидази – 245 Од/л. Який синдром у цьому випадку характеризує цей показник?
 - A. Холестатичний
 - B. Мезенхімальний
 - C. Синтетичної недостатності печінки
 - D. Цитолітичний
 - E. Пухлинного росту
5. У крові пацієнта виявлено зростання вище норми активності ферментів – лужної фосфатази, γ -глутамілтранспептидази, 5-нуклеотидази, лейцинамінопептидази. Ці зміни свідчать про:
 - A. Порушення цілосності гепатоцитів
 - B. Розвиток холестазу

- C. Розвиток злоякісної пухлини
 - D. Вірусну інфекцію
 - E. Розвиток запального процесу
6. Біль в прав.підребер'ї, нудота, блювота. Лабораторні дослідження: білірубін крові 22,5 мкмоль/л, позитивна реакція на жовчні пігменти, активність лужної фосфатази 185 Од/л, γ -ГТП 112 Од/л, холестерин 8,3 ммоль/л. Діагноз:
- A. Інфекційний гепатит
 - B. Гемолітична жовтяниця
 - C. Первинний рак печінки
 - D. Механічна жовтяниця (жовчекам'яна хвороба)
 - E. Хвороба Жильбера
7. У хворого з алкогольним ураженням печінки спостерігається активація ПОЛ, порушення активності електронтранспортних ланцюгів, активація системи компліменту, посилений синтез глікогену. Ці зміни пов'язані з дією альдегіду:
- A. Мурашиного
 - B. Оцтового
 - C. Пропіонового
 - D. Масляного
 - E. Валеріанового
8. У крові пацієнта спостерігається зростання активності АлАТ, АсАТ, ЛДГ₅, фруктозо-1-фосфатаальдолази, орнітинкарбамойлтрансферази. Ці зміни свідчать про розвиток синдрому:
- A. Холестатичного
 - B. Мезенхімального
 - C. Синтетичної недостатності
 - D. Цитолітичного
 - E. Пухлинного росту
9. У 20-річного студента з'явилися симптоми грипу, що супроводжувалися втратою апетиту і болем у правому підребер'ї. При пальпації печінка була збільшена і болюча. При госпіталізації біохімічні дані становили: загальний білірубін 38 мкмоль/л, АлАТ – 450 Од/л, лужна фосфатаза – 70 Од/л. Попередній діагноз – гепатит. Який синдром є найбільш вираженим у цей період захворювання?
- A. Холестатичний
 - B. Цитолітичний
 - C. Мезенхімально-запальний
 - D. Пухлинного росту
 - E. Синтетичної недостатності
10. У людей може знижуватися ефективність деяких фармацевтичних препаратів, у тому числі снодійних засобів. Це спостерігається після тривалого вживання препаратів одного типу, при хронічному вживанні

алкоголю, у людей, що працюють на підприємствах хімічної галузі. З якими змінами у системі детоксикації печінки це пов'язано?

- A. Активація глюкуронілтрансферази
- B. Активація монооксидази
- C. Активація цитохром Р-450-залежних монооксигеназ
- D. Інгібування глюкуронілтрансферази
- E. Інгібування цитохром Р-450-залежних монооксигеназ

5. ЛІТЕРАТУРА (див. на стор. 105)

Заняття №13

ТЕМА: Біохімічні дослідження при онкопаталогії

МЕТА: Використовуючи знання про онкомаркери визначити їх роль у організмі людини та сформулювати уявлення про лабораторні методи та особливості вивчення рівня онкомаркерів

ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ ПІД ЧАС ПІДГОТОВКИ ТА

ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

- 1) Канцерогенні фактори
- 2) Патогенез пухлинного росту
- 3) Функціональні та антигенні особливості пухлинної тканини
- 4) Біохімія онкологічних захворювань
- 5) Основні пухлинні маркери та їх лабораторне визначення при діагностиці онкопаталогії

ПРАКТИЧНІ РОБОТИ, ЯКІ ВИКОНУЮТЬСЯ НА ЗАНЯТТІ

ПРОТОКОЛ № 13

Дата

1. Визначення рівня карциноембріонального антигену (КЕА) у сироватці крові імуноферментним методом

Принцип методу: твердофазний імуноферментний аналіз на основі «сендвіч»-методу.

Нормальні значення: 2,5 – 5,0 нг/мл

Концентрація КЕА стабільна протягом 2 діб при температурі +2 - +8⁰ С, за умови, що сироватка чи плазма без слідів гемолізу.

Обладнання і реagenти:

- 1) Спектрофотометр вертикального сканування (ридер) з довжиною хвилі 450 нм
- 2) Шейкер-термостат з можливістю підтримування температури +37⁰ С
- 3) Автоматичні піпетки на 0,02; 0,1; 0,15 і 1 мл
- 4) Сироватка крові
- 5) Дистильована вода
- 6) Калібрувальні проби
- 7) Кон'югат-пероксидаза
- 8) Концентрат буферу для промивання
- 9) Розчин тетраметилбензидину (ТМБ)
- 10) Розчин соляної кислоти (стоп-реагент)

Проведення аналізу

1. Всі реагенти перед проведенням аналізу повинні бути доведені до кімнатної температури.
2. Внести по 0,05 мл калібрувальних та досліджуваних зразків у відповідні, відібрані для аналізу лунки
3. Додати у всі лунки по 0,1мл кон'югату
4. Інкубувати стрип протягом 1 години при кімнатній температурі
5. Приготувати буфер для промивання: 5 мл концентрату внести у мірну колбу на 100 мл, дистильованою водою довести до мітки
6. Після закінчення інкубації видалити вміст лунок, промити їх приготованим буферним розчином 5 разів
7. Внести у всі лунки по 0,1 мл розчину ТМБ
8. Інкубувати при кімнатній температурі 20 хв у темному місці
9. Додати у всі лунки по 0,1 мл розчину соляної кислоти (стоп-реагент)
10. Виміряти оптичну щільність у кожній лунці на ридері при довжині хвилі 450 нм

Розрахунок

Визначення вмісту КЕА у кожній з дослідних проб проводиться за калібрувальним графіком з використанням програми імуноферментного ридеру

2. Визначення рівня СА-15-3 у сироватці крові імуноферментним методом

Принцип методу: твердофазний імуноферментний аналіз на основі «сендвіч»-методу.

Нормальні значення: до 25 Од/л

Концентрація СА-15-3 стабільна протягом 2 діб при температурі +2 - +8⁰ С, за умови, що сироватка чи плазма без слідів гемолізу.

Обладнання і реagenти:

- 1) Спектрофотометр вертикального сканування (ридер) з довжиною хвилі 450 нм
- 2) Шейкер-термостат з можливістю підтримування температури +37⁰ С
- 3) Автоматичні піпетки на 0,02; 0,1; 0,15 і 1 мл
- 4) Сироватка крові
- 5) Дистильована вода
- 6) Калібрувальні проби
- 7) Буферний розчин для розведення зразків
- 8) Кон'югат-пероксидаза
- 9) Концентрат буферу для промивання
- 10) Розчин тетраметилбензидину (ТМБ)
- 11) Розчин соляної кислоти (стоп-реагент)

Проведення аналізу

1. Всі реагенти перед проведенням аналізу повинні бути доведені до кімнатної температури.
2. Розвести досліджувані зразки у 51 раз: 0,02 мл сироватки розчинити у 1,0 мл буферного розчину
3. Внести по 0,2 мл калібрувальних та розведених досліджуваних зразків у відповідні, відібрані для аналізу лунки
4. Інкубувати стрип протягом 1 години при температурі +37⁰ С
5. Приготувати буфер для промивання: 5 мл концентрату внести у мірну колбу на 100 мл, дистильованою водою довести до мітки
6. Внести по 0,2 мл розчину кон'югату
7. Інкубувати стрип протягом 1 години при температурі +37⁰ С
8. Після закінчення інкубації видалити вміст лунок, промити їх приготованим буферним розчином 5 разів
9. Внести у всі лунки по 0,1 мл розчину ТМБ
10. Інкубувати при кімнатній температурі 20 хв у темному місці
11. Додати у всі лунки по 0,1 мл розчину соляної кислоти (стоп-реагент)
12. Виміряти оптичну щільність у кожній лунці на ридері при довжині хвилі 450 нм

Розрахунок

Визначення вмісту СА 15-3 у кожній з дослідних проб проводиться за калібрувальним графіком з використанням програми імуноферментного ридеру

3. Визначення активності лужної фосфатази

Принцип методу: Лужна фосфатаза розщеплює фенілфосфат з утворенням фенолу. Окисне сполучення фенолу з 4-амінофеназоном утворює комплекс червоного кольору. Інтенсивність забарвлення визначають фотометрично. Активність ферменту є пропорційною посиленню оптичної щільності розчину.

Лінійність методу: 100 – 10000 нмоль/сек*л

Нормальні значення: чоловіки – 900 – 2290 нмоль/сек*л
жінки – 740 – 2100 нмоль/сек*л
діти – 1200 – 6300 нмоль/сек*л

Активність ферменту стабільна протягом 5 годин при температурі +2 - +8° С, за умови, що сироватка чи плазма відібрані не пізніше 30 хвилин після забору крові.

Обладнання і реagenти:

- 1) Спектрофотометр (фотоелектроколориметр) з довжиною хвилі 500 нм та довжиною оптичного шляху 10 або 5 мм
- 2) Водяний термостат або автоматична водяна баня, які здатні підтримувати температуру (плюс 37 ±1)°С.
- 3) Автоматичні або скляні піпетки на 0,1, 1 і 5 мл
- 4) Мірна колба місткістю 500 та 50 мл
- 5) Сироватка крові
- 6) Фізіологічний розчин
- 7) Буферний розчин, рН 10,0
- 8) Субстратний розчин
- 9) Окислювач (періодат натрію)
- 10) Калібрувальний розчин фенолу

Приготування робочих розчинів

Буферний розчин, рН 10,0. Вміст флакону з буферним розчином кількісно перенести до мірної колби місткістю 500 мл, довести розчин до мітки дистильованою водою. Готовий розчин стабільний протягом місяця у холодильнику.

Субстратно-буферний розчин готують змішуванням буферного розчину і субстрату у співвідношенні 49:1 (1 мл субстрату розвести у 20 – 30 мл буферного розчину у мірній колбі місткістю 50 мл та довести буферним розчином до мітки). Розчин готують перед застосуванням.

Окислювальний розчин. Вміст флакону з окислювачем розвести у 200 – 300 мл дистильованої води у мірній колбі місткістю 500 мл та довести водою до мітки. Розчин стійкий.

Калібрувальний розчин фенолу, 2,5 ммоль/л. З ампули відбирають 2,5 мл розчину фенолу та переносять до мірної колби місткістю 50 мл, доводять дистильованою водою до мітки. Розчин стійкий протягом тижня при зберіганні у холодильнику.

Проведення аналізу

Аналіз проводиться згідно таблиці 1.

Таблиця 1

Відміряти у пробірку, мл:	Дослідна проба	Холоста проба	Калібрувальна проба
Субстратно-буферний розчин	3,0	3,0	3,0
Інкубувати 3 хв при +37°С			
Сироватка крові	0,1		

Калібрувальний розчин фенолу			0,1
Інкубувати 10 хв при +37 ⁰ С			
Окислювальний розчин	3,0	3,0	3,0
Сироватка крові		0,1	

Ретельно перемішати вміст пробірок та інкубувати при температурі 25⁰С протягом 5 хвилин. Виміряти оптичну щільність дослідної (E_{дос}) та калібрувальної проби (E_{каліб}) проти холостої при довжині хвилі 500 нм. Забарвлення розчину стабільне протягом 30 хвилин.

Розрахунок

Розрахунок активності фермента в сироватці крові проводять за формулою

$$C_{\text{дос}} = \frac{E_{\text{дос}}}{E_{\text{каліб}}} \times 8300 \text{ (нмоль/сек*л)}$$

де C_{дос} – активність лужної фосфатази, нмоль/сек*л;

E_{дос} – оптична щільність дослідної проби;

E_{каліб} – оптична щільність калібрувальної проби;

8300 – фактор перерахування, нмоль/сек*л

Заповнити таблицю

№ п/п	№ зразка	Оптична щільність	Абсолютне значення, нмоль/сек*л

Висновок:

4. Визначення тиреоглобуліну імуноферментним методом

Принцип методу: в наборі використовується «сендвіч»-варіант твердофазного імуноферментного аналізу. Для реалізації цього варіанту використані 2 моноклональних антитіла з різною специфічністю до тиреоглобуліну. Один з видів антитіл імобілізований на твердій фазі (внутрішній поверхні лунок), другий вид – зв'язаний з пероксидазою хрину. В лунках, при додаванні досліджуваного зразка та кон'югату анти-

тиреоглобулін-пероксидаза, під час інкубації одночасно відбувається іммобілізація тиреоглобуліну, що знаходиться у досліджуваному зразку, та зв'язування його з кон'югатом. При видаленні вмісту з лунок та промиванні відбувається видалення надлишку кон'югату, який не зв'язався з тиреоглобуліном під час інкубації. Кількість зв'язаного кон'югату прямопропорційна кількості тиреоглобуліну у досліджуваному зразку.

Нормальні значення: 1,5 – 55 нг/мл

Концентрація тиреоглобуліну стабільна протягом 2 діб при температурі +2 - +8⁰ С, за умови, що сироватка чи плазма без слідів гемолізу.

Обладнання і реagenти:

- 1) Спектрофотометр вертикального сканування (ридер) з довжиною хвилі 450 нм
- 2) Шейкер-термостат з можливістю підтримування температури +37⁰ С
- 3) Автоматичні піпетки на 0,05, 0,1 і 1 мл
- 4) Сироватка крові
- 5) Дистильована вода
- 6) Калібрувальні проби
- 7) Кон'югат-пероксидаза
- 8) Концентрат буферу для промивання
- 9) Розчин тетраметилбензидину (ТМБ)
- 10) Розчин соляної кислоти (стоп-реагент)

Проведення аналізу

1. Всі реагенти перед проведенням аналізу повинні бути доведені до кімнатної температури.
2. Внести по 0,05 мл калібрувальних та досліджуваних зразків у відповідні, відібрані для аналізу лунки
3. Додати у всі лунки по 0,1 мл кон'югату
4. Інкубувати стрип протягом 1 години при струшуванні та температурі +37⁰ С
5. Приготувати буфер для промивання: 5 мл концентрату внести у мірну колбу на 100 мл, дистильованою водою довести до мітки
6. Після закінчення інкубації видалити вміст лунок, промити їх приготованим буферним розчином 5 разів
7. Внести у всі лунки по 0,1 мл розчину ТМБ
8. Інкубувати при кімнатній температурі 20 хв у темному місці
9. Додати у всі лунки по 0,1 мл розчину соляної кислоти (стоп-реагент)
10. Виміряти оптичну щільність у кожній лунці на ридері при довжині хвилі 450 нм

Розрахунок

Визначення вмісту тиреоглобуліну у кожній з дослідних проб проводиться за калібрувальним графіком з використанням програми імуноферментного ридеру

МАТЕРІАЛИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. У хворих з пігментною ксеродермою шкіра надзвичайно чутлива до сонячних променів, може розвинутися рак шкіри. Причиною є спадкова недостатність ферменту УФ-ендонуклеази. Унаслідок цього дефекту порушується процес:
 - A. Трансляції
 - B. Реплікації ДНК
 - C. Транскрипції
 - D. Зворотної транскрипції
 - E. Репарації ДНК
2. Чоловік віком 58 років переніс операцію з приводу раку передміхурової залози. Через 3 місяці йому провели курс променевої та хіміотерапії. До комплексу лікарських препаратів входив 5-фтордезоксифуридин – сильний незворотний інгібітор тимідилатсинтази. Синтез якої речовини блокується під дією цього препарату?
 - A. Білка
 - B. іРНК
 - C. рРНК
 - D. тРНК
 - E. ДНК
3. Онкохворому під час курсу хіміотерапії призначено структурний аналог глутаміну – антибіотик азасерин, сильнодіючий інгібітор синтезу пуринових нуклеотидів. До якого типу інгібування за механізмом дії належить азасерин?
 - A. Незворотне
 - B. Конкурентне
 - C. Неконкурентне
 - D. Безконкурентне
 - E. Алостеричне
4. Хворий віком 65 років з діагнозом злоякісна пухлина сліпої кишки скаржиться на кволість, слабкість, головний біль, швидко стомлюваність. Відомо, що в онкологічних хворих знижений імунітет. Це пов'язується з пригніченням активності аденілатдезамінази у лімфоцитах таких хворих. Який процес відбувається за участю цього ферменту?
 - A. Розпад пуринових нуклеотидів
 - B. Розпад піримідинових нуклеотидів
 - C. Синтез піримідинових нуклеотидів
 - D. Синтез пуринових нуклеотидів
 - E. Реутилізація пуринових нуклеотидів
5. Хворі на пігментну ксеродерму характеризуються аномально високою чутливістю до ультрафіолетового випромінювання, результатом чого є поступовий розвиток раку шкіри. Причина цього полягає у нездатності ферментних систем цих людей відновлювати ушкодження спадкового апарату клітин, зумовлені дією зазначеного чинника. З порушенням якого процесу пов'язана ця патологія?

- A. Генної конверсії
 - B. Рекомбінації ДНК
 - C. Генної комплементации
 - D. Репарації ДНК
 - E. Редуплікації ДНК
6. Онкологічному хворому було призначено протипухлинний препарат – метотрексат. Однак через деякий час клітини пухлини втратили чутливість до нього. Унаслідок ампліфікації якого гену це відбулося?
- A. Дигідрофолатредуктази
 - B. Глутатіонредуктази
 - C. Тіоредоксинредуктази
 - D. Рибонуклеотидредуктази
 - E. Метгемоглобінредуктази
7. Метотрексат – структурний аналог фолієвої кислоти є ефективним протипухлинним препаратом і широко використовується в клініці. Він знижує швидкість синтезу пуринових та піримідинових нуклеотидів, гальмує розмноження клітин, які швидко ростуть. Які стадії синтезу нуклеотидів інгібуватимуться при використанні цього препарату?
- A. Синтез рибозо-5-фосфату
 - B. Синтез інозинової кислоти
 - C. Перенесення однокарбонних груп
 - D. Синтез нуклеозидів
 - E. Інгібується активність пірофосфорилази
8. Хворий віком 56 років з діагнозом злоякісна гепатома скаржиться на втомленість, слабкість, нудоту, за останні 2 місяці втратив 12 кг. Спостерігається жовтяничність шкіри та слизових оболонок. Основним маркером у діагностиці злоякісних захворювань печінки є:
- A. α_2 -Макроглобулін
 - B. α -Фетопротеїн
 - C. СА-125
 - D. СА 19-9
 - E. СА 72-4
9. Призначення онкологічним хворим низки протипухлинних препаратів упродовж тривалого часу спричинює розвиток резистентності клітин-мішеней до них. Який процес лежить в основі цього явища?
- A. Ампліфікація генів
 - B. Рекомбінація генів
 - C. Експресія генів
 - D. Мутація генів
 - E. Модифікація генів
10. У шкірі виявлена щільна, рухома, чітко відмежована від прилеглих тканин пухлину. На розрізі вона білого кольору, представлена волокнистою тканиною, клітин мало. Установлено діагноз: фіброма. Принцип лікування онкологічних захворювань зводиться до використання інгібіторів синтезу:

- A. дТМФ
- B. дАМФ
- C. АТФ
- D. УМФ
- E. ЦМФ

5. ЛІТЕРАТУРА (див. на стор. 105)

Заняття №14

ТЕМА: Біохімічні дослідження показників для діагностики коагулопатій

МЕТА: Використовуючи знання про гемостаз визначити роль його лабораторного дослідження та сформулювати уявлення про згортальну та протизгортальну системи крові

ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ ПІД ЧАС ПІДГОТОВКИ ТА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

- 1) Система згортання крові. Роль ендотелію судин і клітин крові в гемокоагуляції
- 2) Судинно-тромбоцитарний гемостаз. Функціональна характеристика тромбоксану і простацикліну
- 3) Коагуляційний гемостаз
- 4) Протизгортальна система крові
- 5) Фібринолітична система крові
- 6) Методи дослідження системи згортання крові та фібринолізу при схильності до тромбозів та ДВЗ

ПРАКТИЧНІ РОБОТИ, ЯКІ ВИКОНУЮТЬСЯ НА ЗАНЯТТІ

ПРОТОКОЛ № 14

Дата

1. Визначення протромбінового часу та протромбінового індексу

Принцип методу: при додаванні до цитратної плазми надлишку тканинного тромбопластину та іонів кальцію час утворення згустку фібрину залежить лише від активності факторів зовнішнього та загального шляху коагуляції – I, II, V, VII та X.

Нормальні значення: протромбіновий час – 14 – 18 сек
протромбіновий індекс за Квіком – 70 – 130%

міжнародне нормалізоване відношення – 0,8 – 1,2

Обладнання і реagentи:

- 1) Водяний термостат з підтриманням температури +37⁰С або напівавтоматичний коагулометр
- 2) Автоматичні або скляні піпетки на 0,05 і 0,1 мл
- 3) Плазма крові
- 4) Тромбопластин, стандартизований за міжнародним індексом чутливості

Приготування реактивів

У флакон з ліофілізованим тромбопластином додати 8,0 мл дистильованої води та розчинити вміст при перемішуванні. Перед проведенням аналізу отриману тромбопластин-кальцієву суміш нагріти до +37⁰С протягом 30 хвилин. Стабільність отриманого reagentу 20 діб при зберіганні у холодильнику.

Отримання плазми для аналізу

Венозну кров взяти у пластикову пробірку на 3,8% цитрат натрію у співвідношенні 9:1, центрифугувати 15 хвилин при 3000 об/хв. Після центрифугування негайно перенести отриману плазму у пластикову пробірку, зберігати при кімнатній температурі не більше 4 годин. Зберігання зразків при +2 +8⁰С не допускається через холодову активацію VII фактору. Для отримання плазми, бідної на тромбоцити, однократне центрифугування крові 15 хвилин при 3000 об/хв

Проведення аналізу

1. У кювету коагулометру додати 0,05 мл цитратної плазми, витримати при кімнатній температурі протягом 1 хвилини.
2. Поставити кювету у вимірюючий блок коагулометру
3. Додати 0,1 мл тромбопластин-кальцієвого розчину, відлік часу почнеться автоматично
4. Дочекатися зупинки вимірювання та зареєструвати отримані дані протромбінового часу, індексу, міжнародного нормалізованого відношення та фібриногену

Заповнити таблицю

№ п/п	№ зразка	Протромбіновий час, сек	Протромбіновий індекс, %	МНВ	Фібриноген, г/л

Висновок:

МАТЕРІАЛИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. Які групи факторів згортання крові виділені відповідно до міжнародної класифікації компонентів гемостазу?
 - A. Тромбоцитарні, еритроцитарні,
 - B. Лейкоцитарні
 - C. Фактори плазми крові
 - D. Тканинні
 - E. Всі відповіді вірні
2. У якому органі, переважно, здійснюється синтез факторів згортання плазми крові?
 - A. Кістковий мозок
 - B. Печінка
 - C. Нирки
 - D. Селезінка
 - E. Всі відповіді вірні
3. Які фактори згортання крові, що містяться в плазмі крові, відносяться до кінінової системи?
 - A. Фібриноген, тромбостенін
 - B. Тромбін
 - C. Тромбопластин
 - D. Прекалікреїн, кініноген
 - E. Всі відповіді правильні
4. Який механізм є пусковим у процесі згортання крові?
 - A. Активація фактора Флетчера
 - B. Активація фактора Хагемана (контакту)
 - C. Активація антигемофільного глобуліну А
 - D. Активація проакцелерину
 - E. Активація проконвертину
5. Які компоненти гемостазу є вітамін-К залежними факторами?
 - A. Тромбопластин
 - B. Проконвертин, протромбін, фактор Стюарта-Прауера
 - C. Прекалікреїн
 - D. Кініноген
 - E. Всі відповіді правильні

6. Який із перелічених лабораторних показників указує на наявність запального процесу?
- A. Збільшення вмісту фібриногену
 - B. Зниження вмісту фібриногену
 - C. Збільшення концентрації іонів кальцію
 - D. Зниження концентрації іонів кальцію
 - E. Збільшення концентрації фібринази
7. Що таке протромбіназа?
- A. Комплекс проконвертину та кальцію
 - B. Комплекс акцелерину і тромбопластину
 - C. Комплекс акцелерину, тромбопластину, кальцію, фактора Стюарта-Прауера
 - D. Тромбопластин
 - E. Всі відповіді вірні
8. Які компоненти гемостазу необхідні для здійснення ретракції кров'яного згустка?
- A. Протромбін, гепарин
 - B. Протромбіназа, тромбін
 - C. Калікреїн, кініноген
 - D. Тромбостенін, кальцій
 - E. Гепарин
9. Під час якої фази згортання крові здійснюється контактна калікреїн-каскадна активація?
- A. Утворення протромбінази
 - B. Утворення тромбіну
 - C. Утворення фібрину
 - D. Посткоагуляційна фаза
 - E. Всі відповіді вірні
10. Що є джерелом фосфоліпиду при формуванні протромбінази по внутрішньому механізмі?
- A. Судинна стінка
 - B. Плазма
 - C. Формені елементи крові
 - D. Білки плазми
 - E. Фібриноген

5. ЛІТЕРАТУРА (див. на стор. 105)

ЛІТЕРАТУРА

Основна:

1. Вороніна Л.М. Клінічна біохімія. – Харків: Основа, 2005.
2. Руководство по клинической лабораторной диагностике. Ч.3: Клиническая биохимия / Под ред. проф. М.А.Базарновой, проф. В.Т.Морозовой – К.: Вища школа. Головное изд-во, 1986. – 279 с.
3. Березов Т.Т, Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. – М.: Медицина, 1998. – 704 с.
4. Вороніна Л.М. Біологічна хімія. – Харків: Основа, 2000. – 608 с.
5. Губський Ю.І. Біологічна хімія. – Київ – Тернопіль: Укрмедкнига, 2000. – 508 с.
6. Клиническая оценка лабораторных тестов: перевод с англ./ Под редакцией Н.У. Тица. – М.: Медицина, 1986. – 480 с.
7. Бойків Д.П., Бондарчук Т.І., Іванків О.Л. та ін.; за ред. Склярова О.Я. Клінічна біохімія. – К.: Медицина, 2006. – 432 с.
8. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: В 2 т. – Мн.: Беларусь, 2000
9. Марри Р., Греннер Д. Биохимия человека: В 2 т. – М.: Мир, 1993.

Додаткова:

1. Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической биохимии. – Минск: Беларусь – 1982. – 367 с.
2. Лифшиц В.М., Сидельникова В.И. Биохимические анализы в клинике. Справочник. – М.: Мед.информ.агентство. – 1998. – 302 с.
3. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике. – М.: Медицина. – 1987. – 437 с.
4. Маршалл В.Дж. Клиническая биохимия. Перевод с англ. – СПб.: Изд-во БИОНОМ «Невский диалект». – 2000. – 368 с.
5. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. – М.: МЕДпресс-информ, 2004. – 920 с.

6. Назаренко Г.И., Кишкун А.А. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. 2-е изд., стереотипное. – М.: Медицина, 2002. – 544 с.
7. Комаров Ф.И., Коровкин Б.Ф., Меньшиков В.В. Биохимические исследования в клинике. – Элиста: АЛЛ «Джангар», 1998. – 250 с.
8. Бышевский А.Ш. Биохимия для врача. – Екатеринбург: Уральский рабочий, 1994. – 384 с.
9. Клиническая биохимия /Под редакцией В.А. Ткачука. – 2-е изд., испр. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. – 512 с.