



Практичний тур

БІОХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ КРОВІ

Концентрація глюкози в крові може змінюватися в наслідок як фізіологічних, так і патологічних процесів. Визначення вмісту глюкози в крові (цільній, плазмі або сироватці) входить до обов'язкової номенклатури аналізів біохімічного дослідження крові та є основним лабораторним тестом в діагностиці цукрового діабету (ЦД) або переддіабетичних станів. Нормальні значення вмісту глюкози в сироватці крові натщесерце наведені в таблиці 1.

Аналіз вмісту глюкози в крові дає змогу встановити наявність цукрового діабету (або переддіабетичного стану), проте не дає повної інформації щодо характеру захворювання. Існує переважно 2 типи ЦД, й в обох випадках пацієнти мають підвищений вміст сироваткової глюкози натще. В лабораторних дослідках при підтвердженні діагнозу також визначають вміст інсуліну та розраховують індекс інсулінорезистентності (НОМА-IR – Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance).

Перший тип цукрового діабету («інсулінзалежний») характеризується неможливістю підшлункової залози продукувати необхідну кількість інсуліну в наслідок ураження β -клітин (аутоімунного, токсичного тощо). Профіль крові таких пацієнтів демонструє високий рівень сироваткової глюкози та низький рівень інсуліну натще.

Діабет другого типу («інсуліннезалежний») пов'язаний зі втратою клітинами чутливості до інсуліну, через що навіть за нормального його рівня тканини не можуть ефективно поглинати глюкозу з кровообігу. В більшості випадків у таких пацієнтів спостерігається компенсаторне збільшення рівня інсуліну, яке, нажаль, не призводить до адекватного зменшення рівня глюкози в крові, через що збільшується показник НОМА-IR.

Референтні значення вмісту інсуліну в сироватці натще та НОМА-IR наведені в таблиці 2.

маркер, ємність з фізіологічним розчином для промивання шприців.

Таблиця 1

Нормальні значення глюкози в сироватці крові натще

Глюкоза, ммоль/л	
Діти:	3,3-5,6
Дорослі:	4,1-5,9
Люди похилого віку:	4,6-6,4
Висока ймовірність діагнозу ЦД:	$\geq 7,0$

Таблиця 2

Референтні значення інсуліну в сироватці натще та НОМА-IR

Інсулін, мкОд/мл:	2,6-24,9
НОМА-IR:	$\leq 3,0$

Мета роботи: провести аналіз з визначення концентрації глюкози глюкозооксидазним методом, обробити та проаналізувати отримані дані.

Матеріали та обладнання: фотоелектроколориметр (ФЕК) з відповідними кюветами для вимірювання, термостат, фізіологічний розчин, буферний розчин, калібрувальний розчин, розчин ензимів, дослідні проби (№1, №2, №3), штатив з 5 пробірками, калькулятор,

УВАГА! При роботі з лабораторним склом необхідно бути обережним та не поспішати! Реактиви містять невелику кількість фенолу. При роботі з розчинами необхідно уникати їх контакту зі шкірою та очима й працювати в гумових рукавичках!

Хід роботи

Глюкозооксидазний метод найбільш широко використовується в клінічній лабораторній діагностиці для визначення глюкози в біологічних рідинах. Принцип методу базується на здатності глюкози окиснюватися киснем повітря в присутності глюкозооксидази до глюконової кислоти та перекису водню, який у присутності пероксидази реагує з фенолом та 4-амінофеназоном з утворенням хіноніміну червоно-фіолетового забарвлення, що можна визначити фотометрично.

1. Підготуйте робоче місце, надягніть гумові рукавички, розкладіть флакони з реактивами перед собою (таким чином, щоб бачити їхню назву та маркування), підпишіть маркером пробірки (рекомендовано: «№1», «№2», «№3», «Калібрувальна», «Холоста») та встановіть їх до штативу (номер штативу відповідає номеру Вашого робочого місця).
 2. За допомогою шприца внесіть 0,2 мл фізіологічного розчину із флакону в пробірку для приготування холостої проби («Холоста»). Внесіть по 0,2 мл кожної дослідної проби у відповідну за номером проби пробірку (№1-3). Внесіть 0,2 мл калібрувального розчину в пробірку для приготування калібрувальної проби («Калібрувальна»). Для отримання більш точних результатів при відбиранні кожного потенційно нового за складом розчину рекомендується промивати шприц фізіологічним розчином з відповідної ємності.
 3. За допомогою шприца в кожну з п'яти пробірок внесіть по 1,0 мл буферного розчину з відповідного флакону.
 4. За допомогою шприца в кожну з п'яти пробірок внесіть по 1,0 мл розчину ензимів з відповідного флакону.
 5. Перевірте, що всі п'ять пробірок мають візуально однаковий рівень рідини та знаходяться в штативі у стійкому положенні.
 6. Розмістити свій штатив в камері термостату таким чином, щоб він стійко стояв на поверхні, спираючись на всі чотири ніжки, та не заважав розміщенню інших штативів. Проби інкубувати 12 хвилин.
 7. По завершенню часу інкубації обережно заберіть свій штатив. Можна побачити, що рідина в пробірках змінила свій колір.
 8. Визначте екстинцію отриманих розчинів (№1, №2, №3) на ФЕК при довжині хвилі в діапазоні 500-550 нм. Значення екстинції занотуйте до **таблиці 1** бланку для відповіді.
- Правила і методика роботи з ФЕК знаходяться на кожному робочому місці.**
9. Після визначення, віднесіть свої пробірки зі штативом до мийної зони. Зніміть гумові рукавички та викиньте їх у сміття.

10. Поверніться на своє робоче місце. Зверніть увагу, що в ході вимірювання було визначено лише екстинцію, що є суто оптичним показником. Для визначення концентрації глюкози в дослідних пробах №1-3 необхідно провести перерахунок за формулою:

$$C = (E_{\text{досл.}} / E_{\text{кал.}}) * K * 10, \text{ де}$$

C – концентрація глюкози в дослідній пробі, ммоль/л; **10** – концентрація глюкози в калібрувальному розчині, ммоль/л; **E_{досл.}** – оптична щільність дослідної проби, од. опт. щільності; **E_{кал.}** – оптична щільність калібрувальної проби, од. опт. щільності; **K** – коефіцієнт розведення (=1).

Округлення чисел здійснюйте до десятих (0,0). Розрахунки та результати занотуйте до **таблиці 1** бланку для відповіді.

11. Проаналізуйте отримані результати. Вкажіть, які з проб належать пацієнтам з нормальним рівнем глюкози, а які пацієнтам з порушеннями вуглеводного обміну. Вважайте, що всі пацієнти були віком 40 років. **Результати** занотуйте до **таблиці 2** бланку для відповіді.

Для контрольних сироваток, в яких було виміряно рівень глюкози, також відомий рівень інсуліну, що був попередньо визначений імуноферментним методом. Для проби №1 його вміст становить 11,4 мкОд/мл, для проби №2 – 3,2 мкОд/мл, й для проби №3 – 21,7 мкОд/мл.

12. Розрахуйте індекс інсулінорезистентності для кожної проби сироватки за формулою:

$$\text{HOMA-IR} = (\text{IRI} * \text{G}) / 22,5, \text{ де}$$

IRI – вміст інсуліну натще, мкОд/мл; **G** – вміст глюкози натще, ммоль/л.

Округлення чисел здійснюйте до десятих (0,0). Розрахунки та результати занотуйте до

таблиці 3 бланку для відповіді.

13. Проаналізуйте отримані дані. Прокоментуйте стан здоров'я кожного з пацієнтів, яким належать дослідні проби №1-3, з боку вуглеводного обміну. Якщо їх стан можна охарактеризувати як діабет – назвіть його тип. Результати занотуйте до **таблиці 4** бланку для відповіді.

БАЖАЄМО УСПІХУ!

БІОХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ КРОВІ

(бланк для відповіді)

Варіант

Таблиця 1

Впишіть відповіді:

Зразок сироватки:	Значення екстинції	Концентрація глюкози:	
		<i>Розрахунок</i>	<i>Концентрація, ммоль/л</i>
№1			
№2			
№3			
Калібрувальна проба		-	-

Таблиця 2

Позначте правильну відповідь, закресливши «×» її:

Пацієнт:	Стан базальної глікемії:		
№1	Гіпоглікемія	Нормоглікемія	Гіперглікемія
№2	Гіпоглікемія	Нормоглікемія	Гіперглікемія
№3	Гіпоглікемія	Нормоглікемія	Гіперглікемія

Таблиця 3

Впишіть відповіді:

Зразок сироватки:	НОМА-ІR:	
	<i>Розрахунок</i>	<i>Значення</i>
№1		

№2		
№3		

Таблиця 4

Позначте правильну відповідь, закресливши «×» її:

Пацієнт:	Ймовірний діагноз:			
№1	Здоровий	ЦД 1 типу	Інсулінорезистентність	ЦД 2 типу
№2	Здоровий	ЦД 1 типу	Інсулінорезистентність	ЦД 2 типу
№3	Здоровий	ЦД 1 типу	Інсулінорезистентність	ЦД 2 типу

БІОХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ КРОВІ
(бланк для відповіді)

Варіант

Таблиця 1

Впишіть відповіді:

Зразок сироватки:	Значення екстинції	Концентрація глюкози:	
		<i>Розрахунок</i>	<i>Концентрація, ммоль/л</i>
№1			
№2			
№3			
Калібрувальна проба		-	-

Таблиця 2

Позначте правильну відповідь, закресливши «×» її:

Пацієнт:	Стан базальної глікемії:		
№1	Гіпоглікемія	Нормоглікемія	Гіперглікемія
№2	Гіпоглікемія	Нормоглікемія	Гіперглікемія
№3	Гіпоглікемія	Нормоглікемія	Гіперглікемія

Таблиця 3

Впишіть відповіді:

Зразок сироватки:	НОМА-ІR:	
	<i>Розрахунок</i>	<i>Значення</i>
№1		

№2		
№3		

Таблиця 4

Позначте правильну відповідь, закресливши «×» її:

Пацієнт:	Ймовірний діагноз:			
№1	Здоровий	ЦД 1 типу	Інсулінорезистентність	ЦД 2 типу
№2	Здоровий	ЦД 1 типу	Інсулінорезистентність	ЦД 2 типу
№3	Здоровий	ЦД 1 типу	Інсулінорезистентність	ЦД 2 типу