

### Лабораторне заняття №3

**Мета заняття:** засвоїти особливості обміну вуглеводів в організмі людини та засвоїти методику визначення концентрації глюкози одним із відомих методів в біохімічній клінічній діагностиці та методику визначення молочної кислоти в біологічному матеріалі.

Перед початком лабораторного заняття вдома виконати **✍ домашнє письмове завдання:**

1. Написати реакції (стадії) синтезу (глікогенезу) та розщеплення глікогену.
2. Глюконеогенез: реакції, ферменти.
3. Нервова й ендокринна регуляція вуглеводного обміну.

Для засвоєння матеріалу необхідно відповісти на ? **питання самоконтролю:**

1. Синтез глікогену, розщеплення глікогену: реакції, ферменти.
2. Глюконеогенез: реакції, ферменти.
3. Пентозофосфатний шлях окиснення вуглеводів та його біологічне загальне значення.
4. Нервова й ендокринна регуляція вуглеводного обміну.
- 5.. Практичне значення роботи щодо визначення концентрації глюкози в крові та сечі.
6. Основний хід роботи проведення досліду, щодо визначення концентрації глюкози в біологічних рідинах глюкозооксидазним методом
7. Розрахунок концентрації глюкози. Норма та контроль якості.
8. Хід роботи проведення досліду, щодо визначення молочної кислоти в біологічному матеріалі.

### Лабораторна робота №1

#### ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ГЛЮКОЗИ В БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ ГЛЮКООКСИДАЗНИМ МЕТОДОМ

**Мета роботи:** засвоїти метод визначення концентрації глюкози в біологічних рідинах (глюкозооксидазним методом).

**Практичне значення роботи:** найчастіше показником вуглеводного обміну з діагностичними цілями є вміст глюкози в крові та сечі. Підвищення рівня глюкози є досить частим симптомом при цукровому діабеті, пухлині кори наднирників, гіперфункції щитовидної залози, захворюванні печінки, ураженнях центральної нервової системи.

**Матеріал:** сироватка (концентрація глюкози стабільна протягом 24 год. при температурі від плюс 2 до плюс 8 °С, за умови, що сироватка або плазма приготовлені не пізніше 30 хв. після забору крові. Якщо утримання

глюкози в сироватці крові або плазмі вище 27,7 ммоль/л, її необхідно розбавити фізіологічним розчином у 5 разів і повторити дослідження); штатив для пробірок, біохімічні пробірки.

**Реактиви:** ензими (розчин): пероксидаза,  $\beta$ ,D-глюкооксидаза, 4-амінофеназон, стабілізатори, активатори, буферний розчин (фосфатний буфер – рН = 7,2-7,4), фенол, калібрувальний розчин глюкози (10 $\pm$ 0,5) ммоль/л, фізіологічний розчин (0,9%-ий розчин натрій хлориду).

#### **Приготування робочих розчинів.**

Для використання набору у варіанті **БІРЕАГЕНТУ** розчини готові до використання і стабільні до закінчення гарантійного терміну придатності (при дотриманні умов збереження – температура від +2 до +16 °С).

**Калібрувальний розчин глюкози розбавляють у 10 разів** (0,1 мл калібрувального розчину глюкози – 10 ммоль/л – змішують із 0,9 мл фізіологічного розчину).

### **Хід роботи**

Аналіз проводиться у відповідності зі схемою, наведеною у таблиці 2.

**Принцип методу:** глюкоза в присутності глюкооксидази окиснюється киснем повітря до глюконової кислоти та гідроген пероксиду, який

у присутності пероксидази реагує з фенолом та 4-амінофеназоном з утворенням хіноніміну *червоно-фіолетового забарвлення*, який визначається фотометрично

при довжині хвилі 540 нм.

Окремо пробірки холостої проби (контрольної проби), калібрувальної проби, холостої проби змішати, витримати 20 хв. при кімнатній температурі (від +18 °С до +25 °С), або 12 хв. при температурі +37 °С.

**Проти холостої проби** вимірюють оптичну щільність калібрувальної проби (Е калібрувальної проби) та дослідної проби (Е дослідної проби).

**Розрахунок концентрації глюкози (С, ммоль/л) за формулою:**

$$C = 10,0 \cdot E \text{ дослідної проби} / E \text{ калібрувальної проби}$$

де: 10 – концентрація глюкози в калібрувальному розчині (ммоль/л);

Е дослідної проби – оптична щільність дослідної проби;

Е калібрувальної проби – оптична щільність калібрувальної проби

#### **Контроль якості.**

Достовірність результатів, що одержують, контролюють за допомогою атестованих контрольних сироваток «Ліонорм» (Чехія) або «Біоконт С» (Росія).

**Нормальні величини вмісту глюкози у сироватці венозної крові складає 4,1-6,11 ммоль/л.**

Таблиця 2

Робоча схема проведення досліду, щодо визначення концентрації глюкози в біологічних рідинах глюкозооксидазним методом

Буферний розчин (мл)	Ензими (мл)	Фізіологічний розчин (мл)	Розведений калібрувальний розчин глюкози (мл)	Матеріал, що аналізують (мл)	Показники оптичної щільності	
					Е калібрувальної проби	Е дослідної проби
Холоста проба (контрольна проба)						
2,00	2,00	0,04	–	–	–	–
Калібрувальна проба						
2,00	2,00	–	0,4	–		–
Дослідна проба (1, 2, 3, ... 10)*						
2,00	2,00	–	–	0,04	–	

Примітка. \* – кількість дослідних проб повинна коливатися від 3-х до 10-и відповідно до достовірності результатів, мінімум 1, 2, 3.

**За результатами лабораторної роботи зробіть загальний висновок.**

### Лабораторна робота №2

#### ВИЗНАЧЕННЯ МОЛОЧНОЇ КИСЛОТИ У БІОЛОГІЧНОМУ МАТЕРІАЛІ

**Мета роботи:** виявити молочну кислоту у м'язовій тканині

**Практичне значення роботи:** за допомогою роботи виявити молочну кислоту у м'язовій тканині, що утворюється під час гліколізу.

**Матеріали і реактиви:** чашка Петрі, ножиці, фарфорова ступка, марля, електроплитка, фільтрувальний папір, штатив для пробірок, пробірки, піпетки; м'язова тканина, 1%-ий розчин фенолу, 1%-ий розчин ферум (III) хлориду, 0,5%-ий розчин молочної кислоти, дистильована вода.

#### Хід роботи

Подрібнюють 2-3 г м'язової тканини у чашці Петрі ножицями та поміщують у фарфорову ступку, де розтирають з 5-6 мл дистильованої води.

М'язову кашкицю, що отримали, фільтрують через два шари марлі. Фільтрат кип'ятять протягом 1 хв. і знову фільтрують.

У 3 пробірки, які містять по 5 мл 1%-ого розчину фенолу, по краплям додають 1%-ий розчин ферум (III хлориду) до появи *інтенсивного фіолетового забарвлення*.

До вмісту **першої** пробірки приливають 1 мл 5%-ого розчину молочної кислоти, **другої** – 1 мл витяжки з м'язової тканини, **третьої** – 1 мл води і добре перемішують.

Результати досліду запишіть у таблицю 3 за аналогією:

Таблиця 3

Визначення молочної кислоти у біологічному матеріалі

Вміст пробірки	Кількість, мл		
	1 пробірка	2 пробірка	3 пробірка
Розчин фенолу	5 мл	5 мл	5 мл
Розчин FeCl <sub>3</sub>	5 крапель	5 крапель	5 крапель
Забарвлення (1)			
Розчин молочної кислоти	1 мл	–	–
Витяжка з м'язової тканини	–	1 мл	–
Дистильована вода	–	–	1 мл
Забарвлення (2)			

**За результатами лабораторної роботи зробіть загальний висновок.**