

Практичне заняття № 7

Тема: Визначення білків у біологічних рідинах

Мета: Опанувати метод визначення білка в сироватці крові і сечі та зробити клініко-діагностичний висновок.

Питання для обговорення:

1. Значення вуглеводів у харчуванні
2. Значення ліпідів у харчуванні
3. Значення білків у харчуванні
4. Значення води та мінеральних речовин у харчуванні
5. Значення вітамінів у харчуванні
6. Основні принципи харчування в онтогенезі.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Загальний білок сироватки крові або загальний білок крові – це велика кількість білків, що містяться в сироватці крові і розрізняються між собою за будовою, властивостями і функціями. У плазмі крові крім містяться альбуміни, глобуліни, фібриноген. У сироватці - альбуміни і глобуліни. Таким чином, вміст загального білка в плазмі крові дещо вищий, ніж в сироватці. Концентрація загального білка в сироватці залежить головним чином від синтезу і розпаду альбумінів і глобулінів. Використовується в діагностиці та лікуванні захворювань печінки, нирок та інших метаболічних або харчових розладів.

Нормальні значення загального білка сироватки крові:

- 1) у новонароджених до 1 місяця – 47,0 — 65,0 г/л,
- 2) у недоношених рівень білка в сироватці може бути набагато нижчим, ніж у доношених - в межах від 36 до 60 г/л,
- 3) у дітей віком 1-12 мес – 50,0-72,0 г/л,
- 4) у дітей 1-4 років – 59,0-79,0 г/л,
- 5) у дітей 4-14 років – 62,0-82,0 г/л,
- 6) у дітей старше 14 років – 64,0-83,0 г/л,
- 7) у дорослих – 65,0-85,0 г/л.
- 8) після 60 років рівень загального білка в сироватці крові нижче приблизно на 2 г/л.

Клінічне значення визначення загального білка сироватки крові:

- Загальний білок сироватки крові є лабораторним показником, що відображає стан гомеостазу.
- Завдяки білкам підтримується в'язкість і текучість крові і формується її об'єм в судинному руслі.
- Концентрація білка забезпечує щільність плазми крові, що дозволяє форменим елементам утримуватися в зваженому стані.
- Білки сироватки крові здійснюють транспортні (перенесення гормонів, мінеральних компонентів, ліпідів, пігментів і т. п.) і захисні (імуноглобуліни, опсоніни, білки гострої фази і ін.) функції, беруть участь в регуляції кислотно-лужного стану організму, є регуляторами згортваності крові.

Таким чином, вміст загального білка є дуже важливим діагностичним параметром при цілому ряді захворювань, особливо пов'язаних з вираженими порушеннями метаболізму.

У клінічній практиці досить часто зустрічаються стани, концентрації загального білка сироватки крові, що характеризуються зміною. Збільшення концентрації загального білка в сироватці крові носить назву гіперпротеїнамії, а зниження — гіпопротеїнемії. *Гіперпротеїнемія* може бути відносною (через втрату води під час опіків, діареї) та абсолютною (через збільшення утворення білків при мієломній хворобі, інфекційних

захворюваннях, ревматизмі). *Гіпопротеїнемія* – зменшення вмісту білка в сироватці крові - виникає в основному за рахунок зменшення альбумінів і має місце при нефротичному синдромі, ураженні печінки, підвищенні проникності стінок судин, білковому голодуванні.

У нормі білок в сечі відсутній або виявляється в мінімальних кількостях, Значна кількість білка в сечі (протеїнурія) – одна з безперечних ознак порушення нормальної роботи нирок, викликаного яким-небудь захворюванням. Збільшенням кількості білка в сечі можуть супроводжуватися різні захворювання – саме вони вважаються основною причиною появи білка в сечі.

Тимчасове підвищення білка в сечі: переохолодження, тривале підвищення температури тіла, інтенсивні фізичні навантаження, тривалий прийом або передозування певними лікарськими засобами, неправильне харчування – занадто велика кількість білка в раціоні, яку організм не здатний нормально перетравити.

Тривале підвищення білка в сечі: полікістозна хвороба нирок, запальне захворювання нирок (гострий або хронічний пієлонефрит), різні види діабету, підвищений артеріальний тиск, деякі захворювання серця, серцева недостатність, ревматоїдний артрит, лейкемія та інші.

Особливістю новонародженого організму є його адаптація до нових життєвих умов. Тому практично у 90 % дітей спостерігається підвищений рівень білка в сечі. Через певний проміжок часу процес роботи нирок нормалізується. Тоді аналіз сечі приходиться в норму. Крім цього вміст білка може збільшуватися через:

- переохолодження дитячого організму;
- будь-яке нервово перенапруження, стрес;
- підвищена температура;
- алергійні реакції;
- брак рідини в організмі;
- поразка шкірного покриву опіками;
- прийом лікарських препаратів протягом довгого часу;
- реакція організму на сонці;
- переляк дитини.

Якщо підвищений білок в сечі у дитини незначно і присутні невеликі відхилення від норми, як правило, це означає, що немає будь-яких патологій в дитячому організмі. Через певний час даний показник приходиться в норму.

У клінічній практиці найбільш поширене визначення білка в сечі якісними пробами з азотною кислотою (чутливість проби 0,033 г/л) і сульфосаліциловою кислотою (чутливість проби становить 0,015 г/л), а також – універсальними індикаторними смужками.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА:

Завдання 1. Визначення загального білка сироватки крові біуретовим методом

Принцип методу: метод ґрунтується на утворенні у лужному середовищі забарвленого у фіолетовий колір комплексу пептидних зв'язків білка з сульфатом міді. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна концентрації білка у сироватці крові і визначається фотометрично.

Прилади та матеріали: колориметр фотоелектричний концентраційний КФК-2МП, біуретовий реактив; стандартний розчин альбуміну (із людської або бичачої сироватки, **60 г/л**), розчин з масовою часткою натрій хлориду 0,9 % (NaCl) (зважують 0,90 г NaCl (х.ч.) і кількісно переносять у мірну колбу на 100 мл, об'єм доводять дистильованою водою до мітки), сироватка крові.

Хід роботи: Беруть три пробірки. У першу пробірку вміщують 0,1 мл сироватки крові (дослідна проба), в другу – 0,1 мл стандартного розчину білка (стандартна проба), у третю – 0,1 мл 0,9% розчину хлориду натрію (контрольна). В усі пробірки додають по 5 мл біуретового реактиву, вміст пробірок обережно перемішують, уникаючи появи піни, і через 30 хв визначають екстинкцію за допомогою фотоелектроколориметра у кюветах на 10 мл при зеленому світлофільтрі (540 нм) проти контрольного розчину.

Розрахунок роблять за формулою

$$C_d = \frac{E_d \cdot C_{ст}}{E_{ст}}$$

де C_d – вміст білка в досліджуваній сироватці крові, г/л;

E_d – екстинкція досліджуваної сироватки крові;

$C_{ст}$ – концентрація білка в стандартному розчині, г/л;

$E_{ст}$ – екстинкція стандартного розчину білка.

Виконати та пояснити результати дослідів, якщо екстинкція стандартного розчину складала 0,08, а досліджуваної сироватки крові 0,1 (концентрація стандартного розчину альбуміну див. вище)

Завдання 2. Визначення загального білка в сечі

Принцип методу: Коагуляція це збільшення розмірів колоїдних часток. Найчастіше всього явище коагуляції зустрічається при денатурації білка від впливу солей важких металів і деяких органічних і неорганічних кислот (трихлорацетатної, сульфосаліцилової, нітратної та ін.).

Прилади та матеріали: технохімічні ваги, секундомір, штатив з пробірками, градуйовані піпетки, розчин з масовою часткою нітратної кислоти 50 , реактив Ларіонової, досліджувана сеча.

Готування реактиву Ларіонової: 20 – 30 г кристалічного натрій хлориду розчиняють у 100 мл дистильованої води при підігріванні, дають відстоятись до охолодження. Надосадочну рідину зливають, фільтрують. Для приготування 10 мл реактиву до 9,9 мл фільтрату натрій хлориду додають 0,1 мл концентрованої нітратної кислоти.

Хід роботи: У пробірку наливають 1 – 2 мл реактиву Ларіонової. Піпеткою обережно по стінці пробірки нашаровують сечу, намагаючись не збовтувати рідину, вмикають секундомір. Відзначають час появи на межі поділу двох рідин каламутно-білого кільця. Кільця, які з'являються вище межі нашарування, утворюються за рахунок випадання солей. Ці кільця зникають при обережному нагріванні.

Норма: Поява тонкого білого кільця на межі поділу середовищ через 2 – 3 хвилини вказує на наявність білка в досліджуваній сечі в кількості 0,033 г/л (0,0033 %).

Якщо кільце з'явилося раніше 2-х хвилин після нашарування, сечу варто розвести дистильованою водою і зробити повторний вимір. При цьому підбирають розведення сечі таким чином, щоб при нашаруванні кільце утворювалось між 2 та 3 хвилинами. Ступінь розведення підбирають у залежності від виду кільця, тобто його ширини, компактності і часу прояву. При ниткоподібному кільці сечу розводять в 2 рази, при широкому – в 4 рази, при компактному – в 8 разів. Кількість білка обчислюють шляхом множення величини 0,033 г/л на ступінь розведення.

Виконати та пояснити результати дослідів

Завдання для самостійного виконання:

Завдання 1. У яких клітинах синтезується особистий фермент, який не утворюється в інших клітинах організму?

№	Знаходження ферменту	Назва ферменту	Хімічна природа ферменту	Речовина-мішень
1	Клітини підшлункової залози	Панкреатична амілаза	білок	Розщеплення полісахаридів у 12-палій кишці (крохмаль)
2	Фібробласти шкіри			Синтез колагену
3				
4				
5				

Примітка: Заповніть таблицю за прикладом №1 у таблиці. № 2 – дозаповнити. № 3-5 – навести свої приклади

Завдання 2. Заповнити таблицю «Гормони, як регулятори метаболізму»

Місце дії гормону	Назва гормону	Хімічна природа гормону	Клітини-мішені	Метаболічний ефект