

Практичне заняття № 2

Тема: визначення глюкооксидазним методом вмісту глюкози в сироватці крові.

Мета: Опанувати глюкозооксидазний метод визначення вмісту глюкози в сироватці крові.

Питання для обговорення:

1. Поняття про метаболізм.
2. Білковий, вуглеводний та ліпідний обмін в онтогенезі.
3. Функції мітохондрій
4. Використання енергії
5. Метаболізм після народження
6. Загальні закономірності енергетичних процесів у дітей
7. Гіпоенергетичні стани у дітей

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 крові, штатив для пробірок, біохімічні пробірки.

Реактиви: ензими (розчин): пероксидаза, β ,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.

Принцип методу: глюкоза в присутності глюкозооксидази 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.

Таблиця

Робоча схема проведення дослідження, 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.

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

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

За результатами лабораторної роботи зробіть загальний висновок, опираючись на результати відео за посиланням: <https://www.youtube.com/watch?v=Icx81BUqzc>

Завдання для самостійного виконання:

1. Заповнити таблицю вмісту глюкози в крові у осіб різних вікових груп:

Вік	Вікова норма глюкози, ммоль/л
До 1 міс.	
До 1 року	
1-14 років	
До 50 років	
50-60 років	
60-90 років	
90 та більше років	

2. Як впливає стать на показник рівня глюкози у крові?
3. Дати визначення поняттю «Гіперглікемія». Причини фізіологічної та патологічної гіперглікемії
4. Дати визначення поняттю «Гіпоглікемія». Причини фізіологічної та патологічної гіперглікемії