Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого»   
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Фармацевтический колледж

**Теория и практика лабораторных**

**биохимических исследований**

сборник методических указаний

для обучающихся к практическим занятиям

по специальности 31.02.03 – Лабораторная диагностика

(базовой, углубленной подготовки)

В 4 частях

Часть 2

Красноярск

2020

УДК 616-074(07)

ББК 53.45

Т 33

Теория и практика лабораторных биохимических исследований : сб. метод. указаний для обучающихся к практ. занятиям по специальности 31.02.03 – Лабораторная диагностика (базовой, углубленной подготовки) / сост. Г. В. Перфильева ; Фармацевтический колледж. – Красноярск : тип. КрасГМУ, 2020. – Ч. 2. - 82 с.

**Составитель:** Перфильева Г.В.;

Сборник методических указаний к практическим занятиям предназначен для аудиторной работы обучающихся. Составлен в соответствии с ФГОС СПО (2014 г.) по специальности 31.02.03 – Лабораторная диагностика, рабочей программой дисциплины (2015 г.) и СТО СМК ФК 8.3.02-17. Выпуск 3.

Рекомендован к изданию по решению методического совета Фармацевтического колледжа (протокол № от «» декабря г.)

© ФГБОУ ВО КрасГМУ

им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого

Минздрава России, Фармацев-тический колледж, 2020

**Оглавление**

[ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ №1 ОБНАРУЖЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ И СПЕЦИФИЧНОСТИ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ. 1](#_Toc478592236)

[ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ №2 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗАВИСИМОСТИ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ, РН СРЕДЫ, НАЛИЧИЯ АКТИВАТОРОВ И ИНГИБИТОРОВ 7](#_Toc478592237)

[ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ №3 ОСОБЕННОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В КДЛ. ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИЙ ЭТАП ИССЛЕДОВАНИЙ 13](#_Toc478592238)

[ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ №4 ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ 20](#_Toc478592243)

[ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 5 ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИНОТРАНСФЕРАЗ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ 24](#_Toc478592244)

[ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 6 ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ. 35](#_Toc478592246)

[ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 7 ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КФК В СЫВОРОТКЕ КРОВИ 40](#_Toc478592247)

[ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 8 ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЛДГ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ 44](#_Toc478592248)

[ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 8 ИТОГОВОЕ ЗАНЯТИЕ ПО ТЕМЕ «ФЕРМЕНТЫ». 48](#_Toc478592249)

[ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 10 ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ГЛЮКОЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ. 50](#_Toc478592250)

[ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 11 ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЛАКТАТА И СИАЛОВЫХ КИСЛОТ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ. 56](#_Toc478592251)

[ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ №12 ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ГЛИКИРОВАННОГО НВ И ФРУКТОЗАМИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ 61](#_Toc478592252)

[ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 13 ГЛЮКОЗОТОЛЕРАНТНЫЙ ТЕСТ. 68](#_Toc478592253)

[ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 14 ИТОГОВОЕ ЗАНЯТИЕ ПО ТЕМЕ «ОБМЕН УГЛЕВОДОВ». 74](#_Toc478592254)

[Литература 78](#_Toc478592255)

# ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ №1 ОБНАРУЖЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ И СПЕЦИФИЧНОСТИ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ.

**Значение темы**: В организме практически нет реакций, которые не катализировались бы ферментами. Ферменты обеспечивают существование таких важнейших процессов жизнедеятельности, как реализация наследственной информации, биоэнергетика, синтез и распад биологических молекул. Наука о питании основана на точных знаниях о расщеплении веществ под влиянием ферментов пищеварительного тракта. Действие многих лекарственных препаратов основано главным образом на взаимодействии с ферментами. Многие проблемы наследственной патологии человека тесно связаны с дефектами или полным отсутствием синтеза специфических ферментов. Проблемы клеточного роста и развития, дифференцировки, физиологических функций (движение, перемещение в пространстве, транспорт веществ, процессы возбуждения и торможения) определяются в большей степени работой ферментов. Все вышеперечисленное позволяет считать данную тему основой для изучения всех последующих тем.

На основе теоретических знаний и практических умений обучающийся должен **знать**:

* классификацию ферментов по сложности строения молекулы и типу катализируемой реакции;
* свойства ферментов;
* механизм действия ферментов;
* регуляцию активности ферментов;
* понятие «изоферменты»;
* строение и органная локализация изоферментов;

**уметь:**

* получать сыворотку и плазму из венозной крови;
* работать с центрифугой;
* работать с термостатом;
* подготавливать, доставлять и хранить биологический материал для исследования активности ферментов;
* определять действие ферментов.

Студент должен овладеть **общими компетенциями**:

OK 2. Организовывать собственную деятельность, определять методы и способы выполнения профессиональных задач, оценивать их эффективность и качество.

ОК 12. Оказывать первую медицинскую помощь при неотложных состояниях.

ОК 13. Организовывать рабочее место с соблюдением требований охраны труда, производственной санитарии, инфекционной и противопожарной безопасности.

Студент должен овладеть **профессиональными компетенциями**

ПК 3.1. Готовить рабочее место для проведения лабораторных биохимических исследований.

ПК 3.2. Проводить лабораторные биохимические исследования биологических материалов; участвовать в контроле качества.

ПК 3.3. Регистрировать результаты биохимических исследований.

ПК 3.4. Проводить утилизацию отработанного материала, дезинфекцию и стерилизацию использованной лабораторной посуды, инструментария, средств защиты.

**План изучения темы:**

**1.Контроль исходного уровня знаний.**

Ответьте на вопросы:

1. Общая характеристика ферментов
2. Понятие «ферменты»
3. Строение ферментов
4. Коферменты – биологическая роль, представители.
5. Изоферменты (на примере ЛДГ), органная специфичность
6. Органная локализация ферментов
7. Особенности ферментативного катализа
8. Механизм действия ферментов
9. Понятие об активном центре, его функции
10. Понятие об аллостерическом центре, его функции
11. Фермент-субстратный комплекс, его значение в катализе
12. Требования к проведению ферментативных исследований

**2. Содержание темы.**

**3. Самостоятельная работа.**

1. Законспектируйте методику проведения практической работы.
2. Подготовьте рабочее место для исследования.
3. Проведите определение действия и специфичности амилазы слюны.
4. Сделайте выводы по работе.
5. Ответьте на дополнительные вопросы.

**Принцип:**

Фермент слюны амилаза при определенных условиях производит гидролиз крахмала до мальтозы.

амилаза  амилаза мальтаза

(С6Н10О5)у-----------(С6Н10О5)х-------------уС12Н22О11-----------nС6Н12О6

**крахмал декстрины мальтоза глюкоза**

|  |  |
| --- | --- |
| **Реактивы:**   1. 1% раствор крахмала. 2. 2% раствор сахарозы. 3. 1% раствор йода. 4. 5% раствор сульфата меди. 5. 10% раствор гидрооксида натрия. 6. Амилаза слюны. 7. Дистиллированная вода. | **Оборудование:**   1. Штатив с пробирками (7 шт). 2. Пипетки глазные. 3. Воронка. 4. Стаканчик. 5. Термостат. 6. Спиртовка. 7. Фильтровальная бумага. |

**Опыт № 1. Обнаружение действия ферментов.**

* Получите ферментативный препарат амилазы слюны (ополоскать рот водой, затем набирать 10-20 мл дистиллированной воды, выдержать во рту 2-3 мин и полученный раствор амилазы слить в стакан);
* В две пробирки налейте по 10 капель раствора крахмала, подпишите пробирки **контроль** и **опыт;**
* В контрольную пробирку налейте 5 капель воды, в опытную – 5 капель амилазы слюны;
* Перемешайте и поставьте в термостат при 370С на 15 мин;
* Затем опытную пробирку разделите пополам, отливая половину содержимого в чистую пробирку;
* В одну пробирку добавьте 1 каплю йода, в другую добавьте 1 каплю сульфата меди и 4 капли гидрооксида меди и нагрейте до кипения (реакция Троммера);
* Аналогичные реакции проведите с контрольной пробиркой;
* Отметьте изменение окраски и данные занесите в таблицу.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| № | Субстрат | Фермент | Реакция с йодом | Реакция Троммера |
| 1 |  |  |  |  |
| 2 |  |  |  |  |

**Опыт № 2. Специфичность действия ферментов.**

* В две пробирки налейте по 10 капель раствора слюны, в первую добавьте 10 капель раствора крахмала, во вторую – 10 капель сахарозы;
* Пробы перемешайте и поместите в термостат при 370С на 15 мин;
* Затем первую пробирку разделите пополам, отливая половину содержимого в чистую пробирку, и проделайте две реакции: пробу Троммера и реакцию с йодом;
* Со второй пробиркой проделайте реакцию Троммера;
* Отметьте изменение окраски и данные занесите в таблицу.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| № | Субстрат | Фермент | Реакция с йодом | Реакция Троммера |
| 1 |  |  |  |  |
| 2 |  |  |  |  |

**Ответьте на вопросы:**

1. Напишите реакцию, которую катализирует амилаза слюны.
2. Назовите субстраты амилазы.
3. Для чего необходима инкубация фермента с субстратом?
4. Какой специфичностью обладает амилаза слюны?
5. Как можно измерить активность амилазы?
6. Дайте определения следующим понятиям: фермент, активный центр, аллостерический центр, простые ферменты, сложные ферменты, апофермент, кофермент, холофермент, обратимость действия, термолабильность, специфичность.
7. **Заполните таблицу:**

**Таблица № 1. Основные отличия неорганических катализаторов и ферментов.**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Показатель | Неорганические катализаторы | Биокатализаторы (ферменты) |
| Химическая природа. |  |  |
| Специфичность |  |  |
| Оптимум t |  |  |
| Оптимум рН. |  |  |
| Давление. |  |  |
| Изменение структуры катализатора в ходе реакции. |  |  |
| Увеличение скорости |  |  |

**8. Прочитайте текст и впишите недостающие слова.**

В нормальных физиологических условиях биохимические реакции в организме протекают с высокими скоростями, что обеспечивается биологическими катализаторами белковой природы –**…………..**

Их изучением занимается наука ………………….

Ферменты, состоящие только из аминокислот, называются ………………………

Ферменты, состоящие из белковой и небелковой частей, называются, …………………………………Белковая часть называется…………………………..

Небелковая - ……………………….Небелковая часть может быть представлена:

* + - 1. ……………….
      2. ……………….
      3. ………………

Основная функция ферментов ………………………………….В молекуле фермнта можно выделить несколько центров: ……………………….. – зона молекулы фермента, специфически взаимодействующая с субстратом, и ………………………………….- зона фермента, ответственная за регуляцию активности фермента.

Так как ферменты по химической природе являются ……………., то им присущи их функции:

1…………….

2…………….

3…………….

4…………….

5…………….

Но кроме общих функции ферменты проявляют свои индивидуальные функции:

1……………………

2……………………

3……………………

4……………………

5…………………...

За специфичность фермента ответствена ………………………структура фермента, именно она определяет его индивидуальные свойства. Для ферментов имеющих четвертичную структуру, характерно наличие ……………………- это ферменты, катализирующие одну и ту же реакцию, но отличающиеся друг от друга по составу, свойствам, местом локализации.

По типу катализируемой реакции ферменты делятся на 6 классов:

* + - 1. ………………
      2. ……………….
      3. ……………….
      4. ………………
      5. ……………….
      6. ……………….

Фермент, расщепляющий крахмал - …………, сахарозу -……………., белки -…….………, жиры -……….… .., лактозу- …………, мальтозу -…………………

**4. Итоговый контроль знаний.**

Тестирование.

**5. Подведение итогов.**

**6. Домашнее задание**

стр. 104-115

# ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ №2 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗАВИСИМОСТИ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ, РН СРЕДЫ, НАЛИЧИЯ АКТИВАТОРОВ И ИНГИБИТОРОВ

**Значение темы**:

Ферменты термолабильные вещества их оптимум действия лежит в диапозоне 35-450С, при снижении или повышении температуры активность фермнтов падает, при температуре более 600С ферменты денатурируют. Ферменты активны только при определенном значении рН: пепсин 1.5-2.5, липаза 7.7-8.2, гастриксин 3.5-4.5.

На основе теоретических знаний и практических умений обучающийся должен

**знать**:

* классификацию ферментов по сложности строения молекулы и типу катализируемой реакции;
* свойства ферментов;
* механизм действия ферментов;
* регуляцию активности ферментов;
* понятие «изоферменты»;
* строение и органная локализация изоферментов;
* применение ферментов в медицине в качестве лекарственных средств и аналитических реактивов;

**уметь:**

* получать сыворотку и плазму из венозной крови;
* работать с центрифугой;
* работать с термостатом;
* подготавливать, доставлять и хранить биологический материал для исследования активности ферментов;
* определять действие ферментов.

Студент должен овладеть **общими компетенциями**:

OK 2. Организовывать собственную деятельность, определять методы и способы выполнения профессиональных задач, оценивать их эффективность и качество.

ОК 12. Оказывать первую медицинскую помощь при неотложных состояниях.

ОК 13. Организовывать рабочее место с соблюдением требований охраны труда, производственной санитарии, инфекционной и противопожарной безопасности.

Студент должен овладеть **профессиональными компетенциями**

ПК 3.1. Готовить рабочее место для проведения лабораторных биохимических исследований.

ПК 3.2. Проводить лабораторные биохимические исследования биологических материалов; участвовать в контроле качества.

ПК 3.3. Регистрировать результаты биохимических исследований.

ПК 3.4. Проводить утилизацию отработанного материала, дезинфекцию и стерилизацию использованной лабораторной посуды, инструментария, средств защиты.

**План изучения темы:**

**1.Контроль исходного уровня знаний.**

Ответьте на вопросы:

1. Общие свойства ферментов и белков.
2. Индивидуальные свойства ферментов.
3. Свойства ферментов: обратимость действия.
4. Свойства ферментов: специфичность действия.
5. Требование к проведению ферментативного анализа.
6. Классификация ферментов по сложности строения
7. Органная локализация ферментов
8. Дать определение «кинетика»ферментативной реакции
9. Факторы, влияющие на скорость ферментативной реакции
10. Зависимсть скорости реакции от концентрации фермента;
11. Зависимсть скорости реакции от концентрации субстрата;
12. Зависимсть скорости реакции от температуры;
13. Зависимсть скорости реакции от рН среды;
14. Зависимсть скорости реакции от наличия активаторов;
15. Зависимсть скорости реакции от наличия ингибиторов.

**2. Содержание темы.**

**3. Самостоятельная работа.**

**Задание для самостоятельной работы:**

1. Законспектируйте методику проведения практической работы.
2. Подготовьте рабочее место для исследования.
3. Проведите определение зависимости активности амилазы слюны от температуры.
4. Сделайте выводы по работе, по полученным результатам построить график зависимости активности амилазы от температуры.
5. Ответьте на дополнительные вопросы.

**Принцип:**

Все ферменты являются термолабильными веществами и проявляют свою максимальную активность при 370С. При снижении или повышении температуры активность ферментов падает, что приводит к образованию промежуточных продуктов или к полной остановке реакции. Так, нерасщепленный крахмал дает с йодом синее окрашивание, а декстрины (промежуточные продукты распада крахмала) в зависимости от величины своих частиц дают с йодом фиолетовую, красно-бурую, оранжевую окраску. Таким образом, по окраске раствора йодом можно судить о степени гидролиза крахмала.

|  |  |
| --- | --- |
| **Реактивы:**   1. 1% раствор крахмала. 2. 1% раствор йода. 3. Раствор амилазы. 4. Дистиллированная вода. | **Оборудование:**   1. Штатив с пробирками (4 шт). 2. Пипетки на 1 и 2 мл, глазные пипетки. 3. Термостат. 4. Водяная баня. 5. Ледяная баня. 6. Спиртовка. |

**Ход работы:**

* В четыре пронумерованной пробирки налейте по 0,5 мл раствора амилазы;
* Пробирку №1 поставьте в лед, №2 – оставьте при комнатной температуре, №3 – в термостат, №4 – в кипящую водяную баню;
* Через 5 мин, когда содержимое пробирок примет нужную температуру, в пробирку №1 добавьте 2 мл крахмала, охлажденного до температуры тающего льда.
* Во 2-ю,3-ю и 4-ю пробирки добавьте по 2 мл раствора крахмала комнатной температуры;
* Во все пробирки добавьте по 2 капли йода;
* Перемешайте содержимое и поместите пробирки в те же самые условия на 15 мин;
* Затем пробирки достаньте, охладите, и оцените активность амилазы по интенсивности и цвету окраски;
* Результаты занесите в таблицу:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| № | Субстрат | Фермент | t | Реакция с йодом |
| 1. |  |  |  |  |
| 2. |  |  |  |  |
| 3. |  |  |  |  |
| 4. |  |  |  |  |

**Ответьте на вопросы:**

1. Перечислите основные свойства ферментов.
2. Как влияет температура на активность ферментов?
3. К какому классу ферментов относится амилаза слюны?
4. Перечислите классы ферментов с примерами.

5. Нарисуйте графики зависимости активности ферментов от температуры, рН, концентрации S и Р.

**«Зависимость активности ферментов от влияния активаторов и ингибиторов».**

**Задание для самостоятельной работы:**

1. Законспектируйте методику.
2. Подготовьте рабочее место для исследования.
3. Проведите определение зависимости активности амилазы слюны от влияния активаторов и ингибиторов.
4. Сделайте выводы по работе.
5. Ответьте на дополнительные вопросы.

**Принцип:**

**А**ктиваторы и ингибиторы влияют на активный центр фермента, способствуя его активации или ингибированию.

|  |  |
| --- | --- |
| **Реактивы:**   1. 1% раствор крахмала. 2. 1% раствор йода. 3. 1% раствор сульфата меди. 4. 1% раствор хлорида натрия. 5. Амилаза слюны. 6. Дистиллированная вода. | **Оборудование:**   1. Штатив с пробирками (3). 2. Пипетки глазные. 3. Стаканчики. 4. Воронка. |

**Ход работы:**

* В 3 пронумерованные пробирки налейте по 10 капель раствора амилазы;
* Затем по одной капле добавьте в 1-ю – хлорид натрия, во 2-ю – сульфат меди, в 3-ю – воды (контроль).
* Перемешайте, внесите в каждую пробирку по 5 капель раствора крахмала и оставьте стоять на 3 мин при комнатной температуре.
* Затем добавьте по 1 капле йода, перемешайте, наблюдайте за окраской растворов и определите, в какой пробирке действовал активатор или ингибитор.
* Результаты оформите в виде таблицы:

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| № | Субстрат | | | Фермент | Реакция с йодом в присутствии | | |
| СuSO4 | NaCI | H2O |
|  | |  |  | |  |  |  |

**Ответьте на вопросы:**

1. Дайте определения и характеристику изоферментам на примере ЛДГ и КК.
2. Дайте определение следующим терминам: активаторы, ингибиторы, денатурация, ингибирование.
3. Перечислите основные виды ингибирования.
4. Объясните принцип конкурентного ингибирования.
5. Ингибитор снижает активность фермента до 30% от исходного уровня. Повышение концентрации субстрата катализируемой реакции восстанавливает 80% активности фермента. К какому типу относится данный ингибитор?
6. **Заполнить таблицу:**

**Классификация ферментов по типу катализируемой реакции.**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Класс фермента | Тип, катализируемой реакции | Представитель класса |
|  |  |  |
|  |  |  |

**7. Решите ситуационные задачи**

**Задача № 1.**

Ингибитор снижает активность фермента до 30% от исходного уровня. Повышение концентрации субстрата катализируемой реакции восстанавливает 80% активности фермента.

1. К какому типу относится данный ингибитор?
2. Характеристика действия данного ингибитора.

**Задача № 2.**

Ингибитор снижает активность фермента до 30% от исходного уровня. Повышение концентрации субстрата катализируемой реакции восстанавливает 35% активности фермента.

1. К какому типу относится данный ингибитор?

2. Характеристика действия данного ингибитора

**4. Итоговый контроль знаний.**

Тестирование.

**5. Подведение итогов.**

**6. Домашнее задание (1)** стр. 104-115

## ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ№3 ОСОБЕННОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В КДЛ. ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИЙ ЭТАП ИССЛЕДОВАНИЙ

**Значение темы:** На современном этапе развития медицины резко повысилось значение биохимических анализов. Применение новых лекарственных средств и новых методов лечения требует постоянного биохимического контроля. Биохимические анализы применяются для диагностики, контроля за состоянием пациентов (мониторинг), скрининга различных заболеваний и прогнозирования. Таким образом, главная задача биохимической лаборатории состоит в том, чтобы обеспечить врача биохимической информацией, необходимой для лечения больного. Такая информация представляет ценность только если она точна, соответствует клинической ситуации и правильно используется врачем в процессе принятия решений.

На основе теоретических знаний и практических умений обучающийся должен

**знать**:

* задачи и значение клинико-биохимических исследований в медицине для постановки дифференциального диагноза, выбора метода лечения, контроля за правильностью назначенного лечения, критерия излеченности, скрининга, мониторинга и прогноза заболеваний;
* основные правила проведения клинико-биохимических исследований на преаналитическом, аналитическом и постаналитическом этапах;
* унифицированные методы исследования;
* основы комплексного подхода к лабораторным обследованиям;
* принципы и основы тактики биохимических исследований;
* систему СИ;
* содержание Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-диагностических учреждений (Утв. Минздравом СССР 17.01.91)
* правила работы и техники безопасности в биохимических лабораториях;
* правила сбора, транспортировки и хранения биоматериала;
* ТБ при работе с биологическим материалом
* Приказы МЗ РФ №254; 408; 380.
* Требования к проведению ферментативных исследований

**уметь:**

* организовывать рабочее место для проведения клинико-биохимических исследований;
* собирать, транспортировать и хранить биологический материал;
* интерпретировать полученные результаты клинико-биохимических исследований.

Студент должен овладеть **общими компетенциями**:

OK 1. Понимать сущность и социальную значимость своей будущей профессии, проявлять к ней устойчивый интерес.

ОК 2. Организовывать собственную деятельность, определять методы и способы выполнения профессиональных задач, оценивать их эффективность и качество.

OK 3. Решать проблемы, оценивать риски и принимать решения в нестандартных ситуациях.

ОК 9. Быть готовым к смене технологий в профессиональной деятельности.

ОК 13. Организовывать рабочее место с соблюдением требований охраны труда, производственной санитарии, инфекционной и противопожарной безопасности.

Студент должен овладеть **профессиональными компетенциями**

ПК 3.1. Готовить рабочее место для проведения лабораторных биохимических исследований.

**План изучения темы:**

**1.Контроль исходного уровня знаний.**

Ответьте на вопросы:

1. Виды биологического материала
2. Способы забора биологического материала
3. Транспортировка, хранение и первичная обработка биологического материала
4. Методы биохимических исследований
5. ТБ при работе в КДЛ (работа с кислотами, щелочами, электроприборами)
6. ТБ при работе с биологическим материалом
7. Требования к проведению ферментативных исследований
8. Органоспецифичные ферменты.
9. Требования к диагностически значимым ферментам

**2. Содержание темы.**

**1. Биологический материал для биохимических исследований.**

**Материалом для биохимических исследований** в КДЛ могут быть:

* Биологические жидкости внутренних сред организма - цельная кровь, сыворотка и плазма крови, спино-мозговая жидкость, лимфа.
* Биологические выделения (экстракты) – моча, желчь, слюна, желудочный и кишечный соки, кал, пот и др.

В качестве **антикоагулянтов** могут быть использованы следующие вещества:

1. Этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) – связывает и эффективно удаляет ионы кальция, защищает клетки крови от разрушения. Добавляют в кровь для выполнения гематологических исследований.
2. Гепарин (в виде натрий гепарина или калий гепарина) - ингибирует превращение протромбина в тромбин. Используют для получения плазмы крови для биохимических исследований.
3. Цитрат натрия– связывает и эффективно удаляет ионы кальция. Добавляют для получения плазмы необходимой для исследования процессов свертывания крови.
4. Оксалат натрия или оксалат аммония – связывает и эффективно удаляет ионы кальция. Добавляют (вместе с фторидом натрия) для получения крови и исследования в ней уровня глюкозы.
5. Фторид натрия – ферментный яд, который прекращает метаболизацию глюкозы в крови после её сбора, т.е. сохраняет её концентрацию.
6. **Этапы лабораторных исследований.**

При лабораторных исследованиях могут возникать случайные или систематические ошибки, которые могут влиять на постановку диагноза, на лечение больного и, в конечном счете, на здоровье человека, поэтому важно соблюдать меры по их предотвращению. Для этого на всех этапах анализа соблюдают следующие правила контроля качества лабораторных исследований:

**1 этап клинико-биохимических исследований - преаналитический.**

На данном этапе нужно соблюдать 3 условия:

1. Правильное составление запроса на анализ, в котором должно быть указано следующее:

* Фамилия И. О., пол и дата рождения пациента.
* Имя врача (в срочных случаях с указанием телефона).
* Клинический диагноз (описание проблемы).
* Требуемые анализы.
* Тип анализируемого материала.
* Дата и время взятия пробы.
* Назначенное лечение (например, медикаменты).

1. Строго соблюдать условия забора биологического материала:

* Срок сбора, время взятия.
* Подготовка обследуемого (или участка тела обследуемого).
* Процедура взятия биоматериала.
* Чистота посуды и материалов для забора (одноразовые шприцы).
* Факторы внешней среды (особенно температура).
* Наличие или отсутствие консервантов, антикоагулянтов.
* Первичная обработка биоматериала.

1. Строго соблюдать условия транспортировки биоматериала (особенно при исследовании активности ферментов).

**2 этап клинико-биохимических исследований - аналитический.**

На этом этапе важно:

1. Правильно выбрать метод для исследования того или иного вещества. Важно чтобы метод был:

* чувствительным (способность метода выявлять наименьшие различия между двумя концентрациями веществ);
* специфичным (способность метода измерять лишь тот компонент, для определения которого он предназначен);
* точным (степень приближения полученного значения к истинному содержанию вещества в биологической жидкости);
* обладать воспроизводимостью (разброс показателей, полученных при анализе нескольких проб одного и того же образца биоматериала);
* обладать диагностической ценностью (изменения данного вещества или ряда веществ в биоматериале, должно говорить о каком то определенном заболевании).

1. Правильно подготовить оборудование, посуду и реактивы в соответствии с методикой.
2. Точно выполнять исследование по методике.
3. Правильно проводить расчеты и интерпретировать полученные результаты.

**3 этап клинико-биохимических исследований – постаналитический**, на этом этапе необходимо обращать внимание на следующее:

1. Правильность оформления бланков анализа.
2. Лабораторно-клиническую интерпретацию результатов.
3. Доведение полученной информации до сведения лечащего врача.

**Требования для проведения ферментативных исследований**

Ферменты – специфические белки, играющие роль биокатализаторов.

Принцип энзимодиагностики - почти все ферменты функционируют внутри тех клеток, в которых они синтезируются, за исключением ряда ферментов плазмы крови и органов пищеварения. Ферменты являются важнейшими компонентами клетки, они теснейшим образом связаны с разнообразными процессами жизнедеятельности. Установлено, что многие заболевания человека связаны с нарушениями деятельности ферментов.

При проведении ферментативных исследований следует соблюдать следующие требования:

* Сыворотка должна быть быстро отделена от сгустка крови, без следов гемолиза, так как активность многих ферментов в эритроцитах больше, чем в плазме и результаты исследования будут завышены
* Хранение сыворотки, как правило, сопровождается снижением активности ферментов. Для большинства из них активность не изменяется при комнатной температуре в течение 6 – 8 часов, около недели – при 4оС, на протяжении одного месяца – в замороженном состоянии.
* Лабораторная посуда должна быть без следов кислот и щелочей, так как ферменты очень чувствительны к изменению рН, что сказывается на их активности
* Наличие на посуде синтетических моющих средств снижает активность ферментов
* Многие антикоагулянты способны повышать или понижать активность ферментов (гепарин и оксалат подавляют активность ферментов)
* Ферменты являются термолабильными, поэтому все исследования проводят при 37оС.
* Прием некоторых лекарственных препаратов перед анализом, может повлиять на активность исследуемого фермента

**3. Самостоятельная работа.**

1. Записать в тетрадь и внимательно изучить этапы биохимических исследований.
2. В методических пособиях ознакомиться с ТБ при работе в КДЛ
3. Законспектировать ТБ при работе с биологическими материалами.
4. Решить задачи:

**Задача № 1.**

Необходимо провести определение количества гемоглобина гемиглобинцианидным методом на фотоэлектроколориметре (ФЭК).

Задания:

1. Укажите, к какому типу лабораторной аппаратуры относится ФЭК;
2. Опишите правила техники безопасности при работе с фотоэлектроколориметром;
3. Назовите дезинфицирующий раствор, используемый для обеззараживания кювет ФЭК после проведения исследования.

**Задача № 2.**

При работе на центрифуге произошло поражение медицинского лабораторного техника электрическим током.

Задания:

1. Укажите возможные причины несчастного случая;

1. Составьте алгоритм оказания первой медицинской помощи пострадавшему;
2. Укажите нормативный документ по правилам работы с аппаратурой и приборами в КДЛ.

**Задача № 3.**

При приготовлении раствора уксусной кислоты медицинский лабораторный техник разлил кислоту на пол и на кожный покров левой руки.

Задания:

1.Составьте алгоритм оказания первой медицинской помощи пострадавшему;

2. Укажите меры, необходимые для нейтрализации пролитой на пол кислоты;

3. Опишите правила хранения кислот в лаборатории.

**Задача № 4.**

При определении кетоновых тел в моче пробой Легаля медицинский лабораторный техник разлил раствор едкого натра на пол и на кожный покров левой руки.

Задания:

1.Составьте алгоритм оказания первой медицинской помощи пострадавшему;

2. Укажите меры, необходимые для нейтрализации пролитого на пол раствора щелочи;

3. Опишите правила хранения щелочей в лаборатории.

**Задача № 5.**

При проведении гематологических исследований произошло попадание крови на поверхность рабочего стола, на халат, кожу рук и слизистую оболочку ротовой полости медицинского лабораторного техника.

Задания:

1. Опишите тактику обработки кожного покрова и слизистых оболочек;

2. Опишите тактику обработки загрязненной инфицированным материалом поверхности стола и рабочей одежды;

3. Опишите основные правила работы с биологическим материалом (кровью) в КДЛ.

1. Ознакомиться с приказами МЗ РФ № 254, 408, 380 записать их в тетрадь
2. Заполнить таблицу:

**Получение биологического материала для биохимических исследований.**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Характеристика**  **биоматериала** | **Кровь** | **Плазма** | **Сыворотка** |
| 1.Подготовка посуды. |  |  |  |
| 2.Использование специальных веществ. |  |  |  |
| 3. Отстаивание. |  |  |  |
| 4.Центрифугирование |  |  |  |
| 5.Условия хранения. |  |  |  |
| 6. Время исследования. |  |  |  |
| 7.Отличительные особенности. |  |  |  |

# 4. Итоговый контроль знаний.

# Тестирование.

# 5. Подведение итогов.

# 6. Домашнее задание (1) стр. 104-115

# ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ №4 ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

**Значение темы**:

**Амилаза -** фермент, осуществляющий расщеплении крахмала и гликогена, наиболее богаты им поджелудочная и слюнные железы. Активность амилазы в сыворотке крови **повышается** (гиперамилаземия) при таких патологиях как, острый панкреатит, обострении хронического панкреатита;паротите (воспалении слюнных желез);

На основе теоретических знаний и практических умений обучающийся должен **знать**:

* классификацию ферментов по сложности строения молекулы и типу катализируемой реакции;
* свойства ферментов;
* механизм действия ферментов;
* регуляцию активности ферментов;
* понятие «изоферменты»;
* строение и органная локализация изоферментов;
* требования к ферментам в энзимодиагностике;
* клинико-диагностическое значение определения активности ферментов;
* понятие «энзимопатии»: наследственные (первичные) и приобретенные (вторичные);
* биохимические основы энзимопатий;

**уметь:**

* работать с термостатом;
* подготавливать, доставлять и хранить биологический материал для исследования активности ферментов;
* определять активность альфа-амилазы кинетическим методом в биологических жидкостях организма человека;
* оценивать результаты исследований и интерпретировать их;
* заполнять бланки исследований.

Студент должен овладеть **общими компетенциями**:

OK 2. Организовывать собственную деятельность, определять методы и способы выполнения профессиональных задач, оценивать их эффективность и качество.

ОК 12. Оказывать первую медицинскую помощь при неотложных состояниях.

ОК 13. Организовывать рабочее место с соблюдением требований охраны труда, производственной санитарии, инфекционной и противопожарной безопасности.

Студент должен овладеть **профессиональными компетенциями**

ПК 3.1. Готовить рабочее место для проведения лабораторных биохимических исследований.

ПК 3.2. Проводить лабораторные биохимические исследования биологических материалов; участвовать в контроле качества.

ПК 3.3. Регистрировать результаты биохимических исследований.

ПК 3.4. Проводить утилизацию отработанного материала, дезинфекцию и стерилизацию использованной лабораторной посуды, инструментария, средств защиты.

**План изучения темы:**

**1.Контроль исходного уровня знаний.**

Ответьте на вопросы:

1. Классификация ферментов по сложности строения молекулы и типу катализируемой реакции;
2. Свойства ферментов;
3. Механизм действия ферментов;
4. Регуляция активности ферментов;
5. Понятие «изоферменты»;
6. Строение и органная локализация изоферментов;
7. Требования к ферментам в энзимодиагностике;

**2. Содержание темы.**

**Требования для проведения ферментативных исследований**

При проведении ферментативных исследований следует соблюдать следующие требования:

* Сыворотка должна быть быстро отделена от сгустка крови, без следов гемолиза, так как активность многих ферментов в эритроцитах больше, чем в плазме и результаты исследования будут завышены
* Хранение сыворотки, как правило, сопровождается снижением активности ферментов. Для большинства из них активность не изменяется при комнатной температуре в течение 6 – 8 часов, около недели – при 4оС, на протяжении одного месяца – в замороженном состоянии.
* Лабораторная посуда должна быть без следов кислот и щелочей, так как ферменты очень чувствительны к изменению рН, что сказывается на их активности
* Наличие на посуде синтетических моющих средств снижает активность ферментов
* Многие антикоагулянты способны повышать или понижать активность ферментов (гепарин и оксалат подавляют активность ферментов)
* Ферменты являются термолабильными, поэтому все исследования проводят при 37оС.
* Прием некоторых лекарственных препаратов перед анализом, может повлиять на активность исследуемого фермента

**Колориметрические кинетические методы**

К этой группе можно отнести методы, аналогичные методам по конечной точке, только фотометрирование в этом случае проводят на линейном участке кинетической кривой. Скорость изменения оптической плотности реакционной смеси (скорость ферментативной реакции) прямо пропорциональна концентрации аналита. Для определения скорости реакции проводят два (двухточечная кинетика) или несколько (многоточечная кинетика) измерений оптической плотности через четко фиксированные интервалы времени.

Расчет концентрации аналита проводят относительно калибратора. Все измерения оптической плотности должны производиться точно на линейном участке кинетической кривой.

**УФ кинетические методы определения активности ферментов**

Это методы, основанные на оптическом тесте Варбурга. В этих методах на первом этапе происходит ферментативное превращение соответствующего аналита с образованием продуктов, которые в последнем этапе ферментативных реакций окисляют NADH в NAD+ или NADPH в NADP+.

Скорость окисления восстановленных никотинамидадениндинуклеотидных коферментов пропорциональна концентрации аналита. Для определения скорости реакции проводят два или несколько измерений оптической плотности при 340 нм через четко фиксированные отрезки времени на линейном участке кинетической кривой. Таким образом определяют изменение оптической плотности в минуту и рассчитывают концентрацию аналита относительно калибровочного раствора определяемого аналита.

**Основные правила работы с ферментами**

1. Нельзя сильно встряхивать растворы ферментов и допускать образования пены при их перемешивании, так как ферменты при этом могут инактивироваться в результате воздействия на них кислорода воздуха.

2. Растворенные, лиофильно высушенные реагенты, контрольные материалы и контрольные сыворотки, содержащие ферменты, перед использованием следует выдержать при комнатной температуре в течение времени, указанного в инструкции, чтобы фермент приобрел конформационно активное состояние.

Необходимо строго соблюдать условия ферментативной реакции, указанные в инструкции: время и температуру инкубации, соотношение реагент/сыворотка.

3. Время начала и окончания ферментативной реакции следует точно фиксировать (автоматически), причем в случае определения активности ферментов и кинетических методов определения аналитов для каждой отдельной пробы, а не для серии целиком, иначе результаты анализа будут неверными. Началом реакции считается момент добавления сыворотки (или стартера) в реакционную смесь, а также окрашивающего реагента, если реакция двухстадийная.

4. Перед началом ферментативной реакции температуру рабочего реагента необходимо довести до значения, указанного в инструкции (37С), и обеспечивать его поддержание в течение всего времени анализа с точностью ±0,10С. В случае ферментативных методов анализа желательно, а при определении активности ферментов обязательно использовать термостат.

**Клинико-диагностическое значение определения активности амилазы**

**Амилаза (диастаза) -** фермент, осуществляющий гидролитическое расщеплении крахмала и гликогена до мальтозы и глюкозы.

амилаза  амилаза мальтаза

(С6Н10О5)у-----------(С6Н10О5)х-------------уС12Н22О11-----------nС6Н12О6

**крахмал декстрины мальтоза глюкоза**

Наиболее богаты им поджелудочная и слюнные железы. Содержание амилазы в сыворотке крови связано с приемом пищи: днем активность выше, чем ночью. Плазма крови человека содержит два изофермента амилазы: (Р) панкреатическую и (S) слюнную. У здоровых людей соотношение этих изоформ в крови приблизительно одинаково, в моче уровень панкреатической амилазы в 2 раза выше.Альфа-амилаза попадает в кровь вследствие цитолиза клеток, содержащих этот фермент, с мочой секретируется Р-тип амилазы.

**Норма активности амилазы:**

Сыворотка крови – менее 220 МЕ/л

Моча - менее 1000 МЕ/л

Повышение активности амилазы в сыворотке крови **– гиперамилаземия** отмечается при:

* Остром панкреатите (в 10-40 раз, приходя к норме на 6-7 сутки, если активность сохраняется увеличенной более 5 суток, это говорит о развитии хронического процесса);
* Обострении хронического панкреатита;
* Паротите (воспалении слюнных желез);
* Почечной недостаточности, хлестазе, холецистите – незначительное повышение;
* Может быть вызвана приемом алкоголя, адреналина, наркотических веществ.

**Снижение** активности амилазы в сыворотке крови – **гипоамилаземия** наблюдается при:

* Заболеваниях печени (гепатитах, механической желтухе, циррозе);
* Сахарном диабете;
* Гипотереозе;

**Повышение** активности в моче – **гиперамилазурия**, наблюдается при:

* Остром панкреатите (имеет большее диагностическое значение, чем определение в сыворотке, так как держится более 7 суток);
* Паротите;

**Снижение** активности фермента в моче – **гипоамилазурия**, наблюдается при:

* почечной недостаточности.

**Метод определения** активности амилазы колориметрический кинетический.



Набор «Альфа-АМИЛАЗА-ОЛЬВЕКС» предназначен для количественного определения активности альфа-амилазы в сыворотке крови и моче человека кинетическим методом в клинической лабораторной диагностике.  
 **Состав набора:** буферный раствор 200мл, субстрат синтетический EPS 50 мл. Непосредственно перед анализом приготовить необходимое количество рабочего раствора, смешав 4 части буферного раствора и 1 часть субстрата.

**Принцип метода: п**од действием фермента a-амилазы синтетический субстрат EPS гидролизуется с образованием нитрофенилмальтозидов, которые подвергаются дальнейшему расщеплению a-глюкозидазой до глюкозы и окрашенного продукта реакции р-нитрофенола. Скорость нарастания концентрации р-NP в ходе второй реакции определяется по увеличению оптической плотности реакционной среды при длине волны 405 нм и пропорциональна активности a-амилазы.

Определение активности амилазы проводим на полуавтоматическом фотометре Stat Fax кинетическим методом: проводим измерение в ходе реакции.

**Материал для исследования:** свежая негемолизированная сыворотка или плазма крови.

**Время взятия**: с 7 до 9 ч утра, при экстренных случаях – в любое время дня.

**Подготовка пациента**: кровь берут натощак. Взятие крови производят до выполнения инструментальных исследований, облучений, операций. Исключить прием алкоголя не менее, чем за 1 сутки до взятия крови и физические нагрузки за 3 дня.

**Методика взятия**: пациент находится в положении сидя или лежа. Исключить длительный венозный стаз – наложение жгута не более 30с. Кровь берут в вакунтейнер. Для получение плазмы используют – гепарин, другие антикоагулянты непригодны. Определение амилазы в сыворотке крови входит в программу экстренных исследований для срочных анализов, рекомендуемое время с момента взятия пробы до выдачи результата – 30 минут.

**Примечание:** С возрастом активность амилазы увеличивается. У женщин активность амилазы выше на 18%, чем у мужчин.

Прием алкоголя, алкоголизм, физические упражнения, курение, повышает активность амилазы. Гемолиз, липемия завышают результаты.

**3. Самостоятельная работа:**

1. Законспектируйте основные правила работы с ферментами.
2. Перепишите в тетрадь принцип метода, нормы амилазы в крови и моче, особенности преаналитического этапа.
3. Оборудуйте рабочее место для практической работы.
4. Выполните практическую работу.
5. Заполните бланк анализа. Оцените полученные результаты.
6. Сделайте вывод по работе.
7. Ответьте на дополнительные вопросы.
8. Заполните предложенные таблицы.
9. Решите ситуационную задачу.

**Ответьте на вопросы:**

1. Назовите место локализации, оптимальное рН и биологическое значение всех форм амилазы.
2. Напишите реакцию, которую катализирует амилаза.
3. К какому классу ферментов относится амилаза?
4. Опишите преаналитический этап определения активности амилазы в крови.
5. Назовите основные заболевания, характеризующиеся повышением активности амилазы. Объясните причину.
6. Расскажите о причинах, видах, лабораторной диагностике и профилактике панкреатита.

**7.Заполнить таблицы:**

Используя теоретический материал лекции, заполните таблицы:

**Таблица 1-Характеристика органоспецифичных ферментов**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Фермент** | **Орган локализации** | **патология** |
| Амилаза |  |  |
| АлТ  аланинаминотрансфераза |  |  |
| АсТ  аспартатаминлотрансфераза |  |  |
| Липаза |  |  |
| КФК-МВ  креатинфосфокиназа-МВ |  |  |
| КФК-ММ  креатинфосфокиназа-МВ |  |  |
| КФК-ВВ  креатинфосфокиназа-МВ |  |  |
| ЛДГ1  Лактатдегидрогеназа1 |  |  |
| ЛДГ5  Лактатдегидрогеназа 5 |  |  |
| трипсин |  |  |
| КФ  кислая фосфатаза |  |  |
| ЩФ  щелочная фосфатаза |  |  |
| ГГТ  Гамма-глутамитрансфераза |  |  |

**Таблица 2 - Спектр ферментов при различных заболеваниях**

|  |  |
| --- | --- |
| **Заболевание** | **Спектр ферментов** |
| Панкреатит |  |
| Инфаркт миокарда |  |
| Гепатит, цирроз |  |
| Механическая желтуха, холецестит |  |
| Травмы мышц |  |
| Простатит |  |
| заболевания костей |  |
| Поражение головного мозга |  |

**8. Решите ситуационную задачу**

При биохимическом исследовании активности амилазы в сыворотки крови больных получены следующие результаты: 400 МЕ/л, 40 МЕ/л, 164 МЕ/л.

1. Оцените результаты каждого сследования.
2. Какова возможная причина изменения активности фермента?
3. Укажите место локализации амилазы, ее биологическое действие, условия для оптимального действия.

**4. Итоговый контроль знаний.**

Тестирование.

**5. Домашнее задание:** лекция «Использование ферментов в медицине»

# ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 5 ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИНОТРАНСФЕРАЗ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

**Значение темы:** Аминотрансферазы: аспартат- и аланинаминотрансферазы осуществляют весьма важную функцию – обратимый перенос аминогрупп с аминонокислот на кетокислоты. Содержатся во всех клетках человеческого организма (больше всего в ткани печени, мышцах сердца, скелетной мускулатуры, почках). Активность АсАТ преобладает в мышечной ткани, а АлАТ – в печени.

Наиболее часто активность аминотрансфераз исследуют с целью дифференциальной диагностики патологии печени и миокарда.

На основе теоретических знаний и практических умений обучающийся должен **знать**:

* классификацию ферментов по сложности строения молекулы и типу катализируемой реакции;
* свойства ферментов;
* механизм действия ферментов;
* регуляцию активности ферментов;
* понятие «изоферменты»;
* строение и органная локализация изоферментов;
* требования к ферментам в энзимодиагностике;
* клинико-диагностическое значение определения активности ферментов;
* понятие «энзимопатии»: наследственные (первичные) и приобретенные (вторичные);

**уметь:**

* подготавливать, доставлять и хранить биологический материал для исследования активности ферментов;
* работать с термостатом; ФЭКом, фотометром.
* определять активность аминотрансфераз кинетическим методом и по «конечной точке» в биологических жидкостях организма человека;
* рассчитывать результаты исследования по эталонному раствору и калибровочному графику;
* оценивать результаты исследований и интерпретировать их;
* заполнять бланки исследований.

Студент должен овладеть **общими компетенциями**:

ОК 2. Организовывать собственную деятельность, определять методы и способы выполнения профессиональных задач, оценивать их эффективность и качество.

ОК 9. Быть готовым к смене технологий в профессиональной деятельности.

ОК 12. Оказывать первую медицинскую помощь при неотложных состояниях.

ОК 13. Организовывать рабочее место с соблюдением требований охраны труда, производственной санитарии, инфекционной и противопожарной безопасности.

Студент должен овладеть профессиональными компетенциями

ПК 3.1. Готовить рабочее место для проведения лабораторных биохимических исследований.

ПК 3.2. Проводить лабораторные биохимические исследования биологических материалов; участвовать в контроле качества.

ПК 3.3. Регистрировать результаты биохимических исследований.

ПК 3.4. Проводить утилизацию отработанного материала, дезинфекцию и стерилизацию использованной лабораторной посуды, инструментария, средств защиты.

**План изучения темы:**

**1.Контроль исходного уровня знаний.**

Ответьте на вопросы:

1. Классификация ферментов по сложности строения молекулы и типу катализируемой реакции.
2. Энзимодиагностика:принцип, примеры.
3. Органоспецифичные ферменты.
4. Требования к диагностически значимым ферментам
5. Характеристика амилазы
6. Особенности определения амилазы
7. Характеристика аминотрансфераз
8. Клинико-диагностическое значение определения аминотрансфераз
9. Клинико-диагностическое значение определения амилазы
10. Нормальные значения активности ферментов (амилазы, ЛДГ, ГГТ, КК, амилазы, АлАТ, АсАТ, ЩФ, КФ).

**2. Содержание темы**

**Недостатки ферментативного анализа**

* Основным недостатком использования ферментов в диагностике повреждения тканей является отсутствие строгой специфичности по отношению к конкретной ткани или типу клеток.

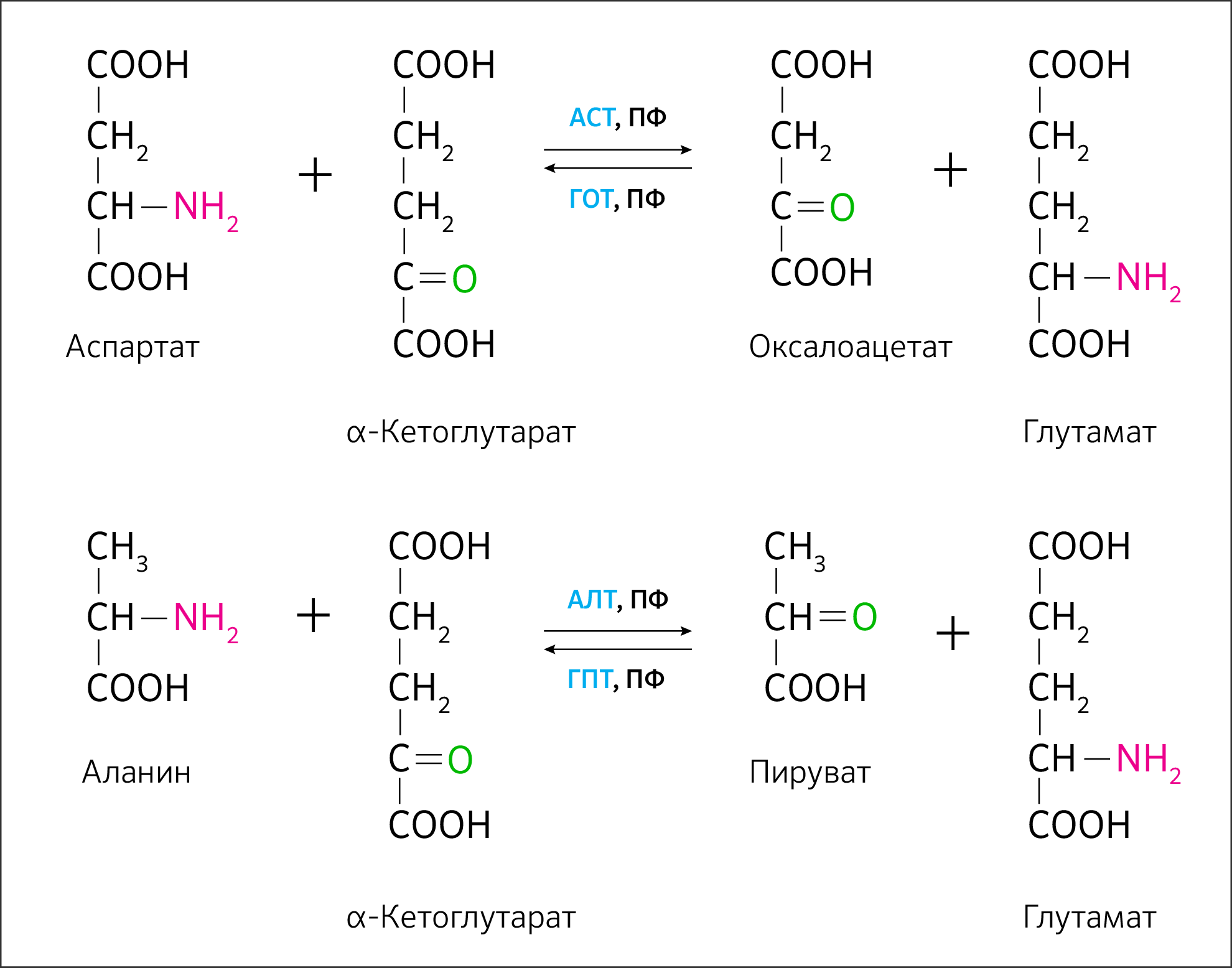
Выход: определяют для каждого органа спектр ферментов (несколько ферментов, характерных для данной ткани: сердце-ЛДГ-1, КК-МВ, АсАТ), определяют изоферменты.

* После повреждения ткани активность внутриклеточных ферментов в плазме возрастает по мере их освобождения из поврежденных клеток, а затем снижается в результате их клиренса.

Выход: важно строго учитывать время взятия пробы относительно первичного повреждения.

**Аминотрансферазы** (трансаминазы) – ферменты, осуществляющие обратимый перенос аминогрупп с аминокислот на кетокислоты. Трансаминирование играет ключевую роль в промежуточном обмене, таккакобеспечивает синтез и разрушение заменимых аминокислот в организме. Аспартатаминотрансфераза АсАТ преобладает в миокарде и мышечной ткани. Аланинаминотрансфераза АлАТ – в печени.

**Уравнения катализируемое АсАТ, АлАТ:**



**Норма активности аминотрансфераз** в сыворотке крови**:**

АсАТ = 8 – 33 Е/л

АлАТ = 4 – 36 Е/л

**Увеличение активности аминотрансфераз** наблюдается при:

* Инфаркте миокарда активность АсАТ в 95% случаев повышается (активность КК, ЛДГ при этом повышена). Возрастание происходит на 4-6 ч. с момента приступа. Оно четко выражено спустя 24-36 ч. (увеличивается в 4-5 раз выше нормы) и лишь на 3-7 сутки снижается до нормы. Отношение показателей активностей КК/АсАТ имеет высокую значимость при дифференциальной диагностике инфаркта миокарда (отношение около 5) и поражениях скелетных мышц (около 27). Коэффициент де Ритиса АсАТ/АлАТ более 1,33.
* Остром вирусном гепатите (АлАТ и АсАТ более чем в 100 раз). Коэффициент де Ритиса менее 1,30.

Быстрое снижение активности аминотрансфераз одновременно с возрастанием гипербилирубинемии свидетельствует об обширных некротических изменениях в ткани печени. В благоприятных ситуациях гепатита активность данных ферментов снижается медленно в течение нескольких недель и даже месяцев.

* Хроническом гепатите;
* Циррозе печени (активность повышается в 5-8 раз);
* Механической желтухе (АлАТ повышается в 50 раз долго остается повышенной, сопровождаясь возрастанием активности ЩФ, ГГТП и содержанием билирубина);
* Токсическом поражении печени;
* Легочной эмболии (активность КК при этом не повышена);
* Пораженияхмышц (мышечной дистрофии, дерматоитозит);

**Снижение активности АсАТ и АлАТ** наблюдаются при:

* Снижении содержания в организме витамина В6.
* Почечной недостаточности.

Наиболее часто активность аминотрансфераз исследуют с целью дифференциальной диагностики патологии печени и миокарда. Для этого определяют показатель, который называется коэффициент де Ритиса:

КдР = АсАТ / АлАТ = 1.30-1,33.

**Метод определения активности аминотрансфераз: UV** - оптимизированный кинетический энзиматическим метод.



**Принцип метода:** под действием фермента аспартатаминотрансферазы (АСТ) в результате переаминирования происходит перенос аминогруппы с аспартата на α-кетоглутарат. Образующийся в данной реакции оксалоацетат при участии фермента малатдегидрогеназы (МДГ) и кофермента НАДН2 превращается в малат. Скорость окисления НАДН2 в ходе второй реакции определяется по уменьшению оптической плотности реакционной среды при 340 нм и пропорциональна активности АСТ.

**Материал для исследования:** свежая негемолизированная сыворотка или плазма крови.

**Время взятия**: с 7 до 9 ч утра, при экстренных случаях – в любое время дня.

**Подготовка пациента**: кровь берут натощак. Взятие крови производят до выполнения инструментальных исследований, облучений, операций. Исключить прием алкоголя не менее, чем за 1 сутки до взятия крови и физические нагрузки за 3 дня, прием лекарств.

**Методика взятия**: пациент находится в положении сидя или лежа. Исключить длительный венозный стаз – наложение жгута не более 30с. Кровь берут в вакунтейнер. Для получение плазмы используют – гепарин, другие антикоагулянты непригодны. Исследование активности аминотрансфераз должнобыть проведено как можно быстрее (1-2 часа после забора). Длительное хранение плазмы приводит к занижению результатов исследование.

**Примечание:** С возрастом активность аминотрансфераз снижается. У женщин активность фермента ниже, чем у мужчин.

Прием алкоголя, алкоголизм, физические упражнения, курение, повышает активность аминотрансфераз. Гемолиз, липемия, билирубинемия завышают результаты.

**3. Самостоятельная работа**

**Задания для самостоятельной работы:**

1. Перепишите в тетрадь принцип методики и нормы аминотрансфераз.
2. Оборудуйте рабочее место для практической работы.
3. Выполните практическую работу по определению активности АлАТ и АсАТ.
4. Заполните бланк анализа. Оцените полученные результаты.
5. Сделайте вывод по работе.
6. Ответьте на дополнительные вопросы.
7. Решите ситуационные задачи.

**Ответьте на вопросы:**

1. К какому классу ферментов относятся АлАТ и АсАТ?
2. Назовите место локализации АлАТ и АсАТ.
3. Что такое коэффициент де Ритиса, как его рассчитывают, что он характеризует.
4. Назовите основные заболевания, при которых изменяется активность аминотрансфераз. Объясните причину.
5. Напишите уравнение реакции, которую катализирует АлАТ.
6. Назовите, какие еще ферменты изменяют свою активность при заболевании печени.

**Решите ситуационные задачи:**

**Задача 1.**

В реанимационное отделение потупил мужчина, 65 лет, с резкой бледностью и выраженной болью в области сердца, отдающей в левую руку и под лопатку. Лабораторный анализ сыворотки крови показал:

**Лабораторный анализ:**

- АсТ – 356 МЕ/л

- ЛДГ1 – 300 МЕ/л

- КК-МВ – 200 МЕ/л

- АлТ – 33 МЕ/л

1. Оцените результаты исследования.
2. Определите коэффициент де Ритиса – АсТ/АлТ, оцените его значение.
3. Напишите к какому классу относится каждый из перечисленных ферментов..
4. Укажите изоферменты креатинкиназы и место их локализации.
5. Сделайте заключение о возможной патологии, ответ поясните.

**Задача 2.**

В инфекционное отделение поступил мужчина, 55 лет, с болью в правом подреберье и желтушностью кожных покровов. Лабораторный анализ сыворотки крови показал:

**Лабораторный анализ:**

- ГГТ – 560 МЕ/л

- ЛДГобщ – 350 МЕ/л

- АсТ – 40 МЕ/л

- АлТ – 290 МЕ/л

1. Оцените результаты исследования.
2. Определите коэффициент де Ритиса – АсТ/АлТ, оцените его значение.
3. Укажите класс АлТ, АсТ, ГГТ.
4. Укажите изоферменты ЛДГ и место их локализации.
5. Сделайте заключение о возможной патологии, ответ поясните.
6. Укажите основные причины развития данного заболевания. Расскажите о профилактике данного заболевания.

**4. Итоговый контроль знаний.**

Тестирование.

**5. Домашнее задание:** лекция «Использование ферментов в медицине»

# ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 6 ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ.

**Значение темы**:

**Фосфатазы,** или гидролазы фосфодиэфиров,- ферменты, отщепляющие остаток фосфорной кислоты от ее органических эфирных соединений. Различают, кислую и щелочную фосфатазы.

**Щелочная фосфатаза** – фосфогидролаза ортофосфорной кислоты, гидролизует разные субстраты при оптимуме рН в пределах 10. ЩФ представлена 11 изоферментами, встречается практически во всех органах и тканях, но наиболее богаты клетки костной ткани и печени. Служит биохимическим маркером кальциево-фосфорного обмена костной ткани.

**Учебная цель:**

Изучить классификацию ферментов, строение и органную локализацию изоферментов; использование показателей активности ферментов в биологических жидкостях организма для диагностики локализации заболеваний; требования к ферментам в энзимодиагностике; клинико-диагностическое значение определения активности ферментов; понятие «энзимопатии»: наследственные и приобретенные

На основе теоретических знаний и практических умений обучающийся должен **знать**:

* классификацию ферментов по сложности строения молекулы и типу катализируемой реакции;
* свойства ферментов;
* механизм действия ферментов;
* регуляцию активности ферментов;
* понятие «изоферменты»;
* строение и органная локализация изоферментов;
* требования к ферментам в энзимодиагностике;
* клинико-диагностическое значение определения активности ферментов;
* понятие «энзимопатии»: наследственные (первичные) и приобретенные (вторичные);

**уметь:**

* подготавливать, доставлять и хранить биологический материал для исследования активности ферментов;
* работать с фотометром.
* определять активность фосфатаз кинетическим методом в биологических жидкостях организма человека;
* оценивать результаты исследований и интерпретировать их;
* заполнять бланки исследований.

Студент должен овладеть **общими компетенциями**:

ОК 2. Организовывать собственную деятельность, определять методы и способы выполнения профессиональных задач, оценивать их эффективность и качество.

ОК 9. Быть готовым к смене технологий в профессиональной деятельности.

ОК 12. Оказывать первую медицинскую помощь при неотложных состояниях.

ОК 13. Организовывать рабочее место с соблюдением требований охраны труда, производственной санитарии, инфекционной и противопожарной безопасности.

Студент должен овладеть **профессиональными компетенциями**

ПК 3.1. Готовить рабочее место для проведения лабораторных биохимических исследований.

ПК 3.2. Проводить лабораторные биохимические исследования биологических материалов; участвовать в контроле качества.

ПК 3.3. Регистрировать результаты биохимических исследований.

ПК 3.4. Проводить утилизацию отработанного материала, дезинфекцию и стерилизацию использованной лабораторной посуды, инструментария, средств защиты.

**План изучения темы:**

**1.Контроль исходного уровня знаний.**

Ответьте на вопросы:

1. Энзимодиагностика: основной принцип.
2. Характеристика метод определения активности ферментов
3. Характеристика амилазы
4. Гиперамилиземия, Гипоамилаземия
5. Гиперамилазурия и гипоамилазурия
6. Принцип метода определения амилазы
7. Характеристика аминотрансфераз: класс,локализация,биологическое значение
8. Принцип метода определения аминотрансфераз.
9. Референтные значения амилазы, аминотрансфераз в крови и моче

**2. Содержание темы**

**Фосфатазы –** ферменты, отщепляющие остаток фосфорной кислоты от ее органических эфирных соединений. Различают кислую и щелочную фосфатазы:

**Щелочная фосфатаза** – ряд ферментов оптимум рН которых лежит в пределах 10. ЩФ представлена 11 изоферментами, встречается практически во всех органах и тканях, но наиболее богаты клетки костной ткани и печени. Поэтому рост костей всегда сопровождается повышением активности ЩФ. Служит биохимическим маркером кальциево-фосфорного обмена костной ткани, скрининговым тестом остеопороза. Активность ЩФ в сыворотке крови детей в 2-3 раза выше активности взрослых (связано с усиленным ростом костей).

**Норма** активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови **20 –130 МЕ/л.**

**Увеличение активности ЩФ** в сыворотке крови наблюдается при:

* Заболеваниях печени, сопровождающихся холестазом (желче-каменная болезнь, механическая желтуха);
* рахите у детей
* заболеваниях костей (остеомаляции, болезни Педжета, саркоме костей, метастазах опухоли в кости);
* миеломной болезни.

**Уменьшение активности ЩФ** в сыворотке крови наблюдается при:

* снижении функции щитовидной железы (гипотиреозе, микседеме);
* старческий остеопороз
* замедленном росте у детей
* гиповитаминозе С, цинге;
* гипервитаминозе Д.

**Кислая фосфатаза –** является лизосомальным ферментом.КФпредставлена тремя разновидностями изоферментов:

1. простатический изофермент (локализован в лизосомах эпителия предстательной железе)
2. печеночный изофермент
3. эритроцитарный изофермент.

Наибольшее диагностическое значение имеет простатическая форма КФ.

**Норма** активности кислой фосфатазы в сыворотке крови **2 –10 МЕ/л.**

**Увеличение активности КФ** в сыворотке крови наблюдается при:

* простатите;
* раке предстательной железы;
* аденоме предстательной железы;
* После манипуляции на простате, биопсии.

**Метод определения активности ЩФ:** кинетика, с диэтаноламиновым буфером (DEA**)**

**Принцип:** щелочная фосфатаза в щелочной среде катализирует реакцию дефосфорилирования субстрата p-нитрофенил- фосфата с образованием p-нитрофенола и фосфата. Скорость образования окрашенного продукта p-нитрофенола определяется по увеличению оптической плотности реакционной среды при 405 нм и пропорциональна активности щелочной фосфатазы.



**Материал для исследования:** свежая негемолизированная сыворотка крови.

**Время взятия**: с 7 до 9 ч утра, при экстренных случаях – в любое время дня.

**Подготовка пациента**: Исключить прием алкоголя не менее, чем за 1 сутки до взятия крови. За несколько дней до обследования отменить антибиотики, исследование проводят натощак.

**Методика взятия**: пациент находится в положении сидя или лежа. Исключить длительный венозный стаз – наложение жгута не более 30с. Кровь берут в вакунтейнер с красной крышкой.

**Примечание:** у мужчин активность ЩФ на 30% выше чем у женщин. У новорожденных и растущих детей активность ЩФ выше, чем у взрослых. Активность фермента после 45 лет, при беременности возрастает.

Прием алкоголя, алкоголизм, прием жирной пищи, физические упражнения, курение, ожирение повышает активность ЩФ. Гемолиз, липемия, билирубинемия, хранение в неотделенной сыворотке завышают результаты.

**3. Самостоятельная работа.**

**Задания для самостоятельной работы:**

1. Перепишите в тетрадь принцип метода и нормы ЩФ и КФ
2. Оборудуйте рабочее место для практической работы.
3. Выполните практическую работу.
4. Заполните бланк анализа. Оцените полученные результаты.
5. Сделайте вывод по работе.
6. Ответьте на дополнительные вопросы.
7. Заполните предложенные таблицы
8. Решите ситуационные задачи.

**Ответьте на вопросы:**

1. К какому классу ферментов относятся фосфатазы?
2. Дайте определение понятию – изоферменты.
3. Назовите сколько изоферментов существует у кислой фосфатазы, чем они отличаются друг от друга.
4. Назовите основные заболевания, при которых изменяется активность кислой, щелочной фосфатаз. Почему?
5. Какие еще ферменты изменяют свою активность при этих заболеваниях?

**Заполните таблицу:**

**Характеристика основных патологий**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Показатель характеристики** | **инфаркт** | **гепатит** | **панкреатит** | **холестаз** |
| Определение |  |  |  |  |
| Этиология |  |  |  |  |
| Клиническая картина |  |  |  |  |
| Лабораторная диагностика:  - клинические  -биохимические |  |  |  |  |

**Решите ситуационные задачи:**

Задача № 1.

Больная поступила в стационар с жалобами на боли в животе, возникающие при приеме жирной пищи, тошноту, слабость, заметную потерю в весе за последние несколько месяцев. Лабораторный анализ показал наличие большого количества нейтрального жира в кале и повышенную активность панкреатической амилазы и липазы в сыворотке крови.

1. Для какого заболевания характерна данная картина?

2. Объясните, почему больная похудела, а в кале обнаружено большое количество жира?

Задача № 2.

При биохимическом исследовании активности щелочной фосфатазы в сыворотки крови трех больных получены следующие результаты: 60 МЕ/л, 180 МЕ/л, 430 МЕ/л

1. Оцените результаты исследования.

2. Какова возможная причина изменения активности фермента?

3. Укажите место локализации щелочной фосфатазы, ее биологическое действие, условия для оптимального действия.

**Задача № 3.**

В хирургическое отделение поступил пациент Смирнов, 55лет, с подозрением на аденому предстательной железы.

1. Предложите специфический биохимический тест для подтверждения диагноза заболевания.
2. Перечислите лабораторное оборудование, необходимое для проведения данного исследования.
3. Назовите условия проведения ферментативной реакции.
4. Укажите активность кислой фосфатазы в норме (в единицах СИ).

**4. Итоговый контроль знаний.**

Тестирование.

1. **Домашнее задание:** лекция «Использование ферментов в медицине»

# ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 7 ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КФК В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

**Значение темы:** В большинстве случаев инфаркт миокард (ИМ) начинают подозревать на основании клинических симптомов и подтверждают при наличии характерных изменений ЭКГ. Фактически у 30% случаев ИМ изменения ЭКГ или отсутствуют или недостаточно типичны для установки диагноза. Именно в случаях трудных для диагностики, определение миокардиальных ферментов позволяет или подтвердить диагноз ИМ, если уровень ферментов повышен, или отвергнуть его, если они остаются в норме. К миокардиальным ферментам относятся АсТ, ЛДГ, КФК.

На основе теоретических знаний и практических умений обучающийся должен **знать**:

* классификацию ферментов по сложности строения молекулы и типу катализируемой реакции;
* свойства ферментов;
* механизм действия ферментов;
* регуляцию активности ферментов;
* понятие «изоферменты»;
* строение и органная локализация изоферментов;
* требования к ферментам в энзимодиагностике;
* клинико-диагностическое значение определения активности ферментов;
* понятие «энзимопатии»: наследственные (первичные) и приобретенные (вторичные);

**уметь:**

* подготавливать, доставлять и хранить биологический материал для исследования активности ферментов;
* работать с фотометром.
* определять активность ферментов кинетическим методом в биологических жидкостях организма человека;
* оценивать результаты исследований и интерпретировать их;
* заполнять бланки исследований.

Студент должен овладеть **общими компетенциями**:

ОК 2. Организовывать собственную деятельность, выбирать типовые методы и способы выполнения профессиональных задач, оценивать их эффективность и качество.

ОК 9. Быть готовым к смене технологий в профессиональной деятельности.

Студент должен овладеть **профессиональными** компетенциями

ПК 3.1. Готовить рабочее место для проведения лабораторных биохимических исследований.

ПК 3.2. Проводить лабораторные биохимические исследования биологических материалов; участвовать в контроле качества.

ПК 3.3. Регистрировать результаты биохимических исследований.

ПК 3.4. Проводить утилизацию отработанного материала, дезинфекцию и стерилизацию использованной лабораторной посуды, инструментария, средств защиты.

**План изучения темы:**

**1.Контроль исходного уровня знаний.**

Ответьте на вопросы:

1. Классификация ферментов по сложности строения молекулы и типу катализируемой реакции
2. Энзимопатии: определение, примеры
3. Энзимодиагностика:определение, примеры
4. Характеристика амилазы
5. Характеристика аминотрансфераз
6. Клинико-диагностическое значение определения аминотрансфераз
7. Клинико-диагностическое значение определения ЩФ, КФ.
8. Нормальные значения активности ферментов (амилазы, ЛДГ, ГГТ, КК, амилазы, АлАТ, АсАТ, ЩФ, КФ).
9. Органоспецифичные ферменты.
10. Требования к диагностически значимым ферментам
11. Принцип UV-кинетических методов

**2. Содержание темы.**

**КК –** креатинкиназа, фермент принимающий участие в энергетическом обмене клеток мышечной, нервной тканей. Катализирует реакцию фосфорилирование креатина с образованием креатинфосфата:

**КК**

**Креатин + АТФ → АДФ + креатинфосфат**

Молекула КК состоит из двух субъединиц – В и М, при комбинации которых образуются три изофермента:

КК-ММ - мышечный

КК-МВ - сердечный

КК-ВВ - мозговой

В плазме здорового человека распределение креатинкиназы следующим образом: КК-ММ-98%, КК-МВ-2%, а КК-ВВ отсутствует.

**Нормальные значения**: КК общая ≤ 170 МЕ/л; КК-МВ ≤ 50 МЕ/л

**Увеличение** активности КК в сыворотке крови наблюдается:

* в раннем периоде инфаркта миокарда (в 10-30 раз через 2-3 часа)
* при поражении мышечной ткани (травме, мышечной дистрофии, тяжелой физической нагрузке)
* шизофрении, эпилепсии.

**Метод определения активности КК – UV-**кинетический.

**Принцип метода: п**од действием фермента креатинкиназы КК в результате фосфорилирования происходит перенос фосфатной группы с креатинфосфата на аденозиндифосфат. Образующийся в данной реакции аденозинтрифосфат запускает ряд сопряжённых ферментативных реакций с участием ферментов гексокиназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в присутствии кофермента НАДФ. Скорость образования восстановленной формы кофермента НАДФH2 определяется по увеличению оптической плотности реакционной среды при 340 нм и пропорциональна активности креатинкиназы.



**Состав набора:** буферный раствор - 100 мл, лиофилизат, содержащий фермент-субстратную смесь – 10 фл. Перед применением растворить лиофилизат одного флакона в 10 мл буферного раствора,предварительно прогрев реактивы до комнатной температуры.

**Материал для исследования:** свежая негемолизированная сыворотка или плазма, полученная с ЭДТА или гепарином.

**Время взятия**: с 7 до 9 ч утра, при экстренных случаях – в любое время дня.

**Подготовка пациента**: так как на результат влияет мышечная активность, пациенту следует вести обычный образ жизни, не малоподвижный, но и без больших физических нагрузок. Исключить прием алкоголя не менее, чем за 1 сутки до взятия крови.

**Методика взятия**: пациент находится в положении сидя или лежа, натощат. Исключить длительный венозный стаз – наложение жгута не более 30с. Кровь берут в вакунтейнер из темного полипропилена, чтобы исключить влияние света на КК.

**Условия доставки**: в рамках программы для экстренных анализов исследование КК рекомендуется проводить не позднее чем через15 минут после поступления крови в лабораторию.

**Примечание:** у мужчин активность КК на50% выше чем у женщин. С возрастом активность КК у мужчин увеличивается у женщин снижается. У новорожденных активность КК выше, чем у взрослых. Сидячий образ жизни, малая мышечная масса, постельный режим, голодание способствует снижению активности КК. Мышечный массаж, мышечные упражнения, психологический, холодовый стресс, хирургические операции, гипоксия, большая мышечная масса вызывают увеличение КК.

**3. Самостоятельная работа:**

**Задания для самостоятельной работы:**

1. Перепишите в тетрадь принцип определения и нормы КК.
2. Оборудуйте рабочее место для практической работы.
3. Выполните определение активности КК в сыворотке крови.
4. Заполните бланк анализа. Оцените полученные результаты.
5. Сделайте вывод по работе.
6. Решите предложенные ситуационные задачи.
7. Заполните предложенные таблицу:

**Характеристика основных диагностических ферментов**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Показатель характеристики** | **Амилаза** | **АсАТ** | **АлАТ** | **ЩФ** | **КФ** | **КК-МВ** | **ЛДГ1,** | **ЛДГ5** | **ГГТ** |
| Локализация в организме |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Норма в сыворотки крови |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Класс фермента по типу реакции |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Метод определения |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Выявляемая патология |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

**Решите ситуационные задачи:**

Задача № 1.

Пациенту Иванову, 65 лет, доставленному бригадой скорой помощи в кардиологическое отделение, врач скорой помощи поставил предварительный диагноз инфаркт миокарда, а дежурный врач стационара – диагноз стенокардия.

1. Предложите ферментативные биохимические тесты для дифференциального диагноза у этого больного.
2. Назовите раздел лабораторной диагностики, использующий в качестве тестов определение активности ферментов в биологических жидкостях организма человека.
3. Укажите биологический материал для этого исследования.
4. Каким требованиям должны отвечать ферменты, активность которых исследуют в качестве биохимических тестов?
5. Укажите значение этих ферментативных показателей в сыворотке крови здорового человека.
6. Укажите направление изменений активности этих ферментов при стенокардии.
7. Укажите направление изменений активности этих ферментов при инфаркте миокарда.

Задача № 2.

В больницу поступил мужчина, 58 лет, с алкогольным поражением печени.

* 1. Активность, каких ферментов будет изменена при поражении печени.
  2. Назовите специфический фермент для данного заболевания.
  3. Дайте полную характеристику: локализация, нормальное содержание, клинико-диагностическое значение.

**Задача № 3.**

Пациентка Смирнова, 45 лет, находится на обследовании в кардиологическом отделении. Из клинико-диагностической лаборатории получены следующие результаты биохимического исследования сыворотки крови:

**Лабораторный анализ:**

- ЛДГобщ – 240 МЕ/л

- ЛДГ1 – 110 МЕ/л

- КФКобщ – 150 МЕ/л

- КФК- МВ – 45 МЕ/л

- АсАТ – 30 МЕ/л

-АлАТ – 32 МЕ/л

- С-реактивный белок – 3.0 мг/л

1. Напишите в общем виде уравнение реакции, которую катализирует креатинфосфокиназа (КФК).
2. Назовите изоферменты креатинфосфокиназы и их локализацию в тканях организма человека.
3. Назовите метод разделения изоформ креатинфосфокиназы в сыворотке крови.
4. Укажите локализацию креатинфосфокиназы в клетке и ее биологическое значение в миокарде.
5. Назовите показатель содержания ЛДГобщ, ЛДГ1, КФКобщ, КФК-МВ, АсАТ в сыворотке крови в норме.
6. Рассчитайте и оцените коэффициент де Ритиса.
7. Оцените полученные результаты биохимических исследований у обследуемой пациентки.
8. Сделайте заключение о возможной патологии у обследуемой пациентки.

**4. Итоговый контроль знаний.**

Тестирование.

**5.Домашнее задание:** лекция «Использование ферментов в медицине»

# ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 8 ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЛДГ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

**Значение темы:**  В большинстве случаев инфаркт миокард (ИМ) начинают подозревать на основании клинических симптомов и подтверждают при наличии характерных изменений ЭКГ. Фактически у 30% случаев ИМ изменения ЭКГ или отсутствуют или недостаточно типичны для установки диагноза. Именно в случаях трудных для диагностики, определение миокардиальных ферментов позволяет или подтвердить диагноз ИМ, если уровень ферментов повышен, или отвергнуть его, если они остаются в норме. К миокардиальным ферментам относятся АсТ, ЛДГ, КФК.

На основе теоретических знаний и практических умений обучающийся должен

**знать**:

* классификацию ферментов по сложности строения молекулы и типу катализируемой реакции;
* свойства ферментов;
* механизм действия ферментов;
* регуляцию активности ферментов;
* понятие «изоферменты»;
* строение и органная локализация изоферментов;
* требования к ферментам в энзимодиагностике;
* клинико-диагностическое значение определения активности ферментов;
* понятие «энзимопатии»: наследственные (первичные) и приобретенные (вторичные);

**уметь:**

* подготавливать, доставлять и хранить биологический материал для исследования активности ферментов;
* работать с фотометром.
* определять активность ферментов кинетическим методом в биологических жидкостях организма человека;
* оценивать результаты исследований и интерпретировать их;
* заполнять бланки исследований.

Студент должен овладеть **общими компетенциями**:

ОК 2. Организовывать собственную деятельность, выбирать типовые методы и способы выполнения профессиональных задач, оценивать их эффективность и качество.

ОК 4. Осуществлять поиск и использование информации, необходимой для эффективного выполнения профессиональных задач, профессионального и личностного развития.

OK 5. Использовать информационно-коммуникационные технологии для совершенствования профессиональной деятельности.

ОК 12. Оказывать первую медицинскую помощь при неотложных состояниях.

ОК 13. Организовывать рабочее место с соблюдением требований охраны труда, производственной санитарии, инфекционной и противопожарной безопасности.

Студент должен овладеть профессиональными компетенциями

ПК 3.1. Готовить рабочее место для проведения лабораторных биохимических исследований.

ПК 3.2. Проводить лабораторные биохимические исследования биологических материалов; участвовать в контроле качества.

ПК 3.3. Регистрировать результаты биохимических исследований.

ПК 3.4. Проводить утилизацию отработанного материала, дезинфекцию и стерилизацию использованной лабораторной посуды, инструментария, средств защиты.

**План изучения темы:**

**1.Контроль исходного уровня знаний.**

Ответьте на вопросы:

1. Классификация ферментов по сложности строения молекулы и типу
2. Энзимодиагностика: определение,принцип.
3. Требования к диагностически-значимым фермента
4. Характеристика амилазы
5. Характеристика аминотрансфераз
6. Характеристика кислой и щелочной фосфатазы
7. Клинико-диагностическое значение определения аминотрансфераз
8. Клинико-диагностическое значение определение амилазы
9. Клинико-диагностическое значение определения ЩФ,КФ.
10. Нормальные значения активности ферментов (амилазы, ЛДГ, ГГТ, КК, амилазы, АлАТ, АсАТ, ЩФ, КФ, ЛДГ,ГГТ).

**2. Содержание темы.**

**ЛДГ –** лактатдегидрогеназа, фермент катализирующий превращение молочной кислоты в пируват и наоборот.

L-лактат + NAD+ ↔ пируват + NAD\*Н +H+

Является внутриклеточным ферментом, находящимся во всех тканях организма. ЛДГ олигомер, состоящий из 4 субъединиц, представленных –Н и М. В плазме выявлено 5 изоферментов:

ЛДГ-1-(4Н) мышце сердца

ЛДГ-2-(3Н1М) эритроциты, тромбоциты, сердце

ЛДГ-3-(2Н2М) в поджелудочной железе

ЛДГ-4-(1Н3М) тромбоциты, легкие.

ЛДГ-5-(4М) локализован в клетках печени, скелетной мускулатуре

Активность ЛДГ в эритроцитах в 100 раз выше, чем в сыворотке крови. В физиологических условиях повышенная активность наблюдается у беременных, новорожденных, после физической нагрузке.

Увеличение активности ЛДГ в сыворотке крови наблюдается при:

* инфаркте миокарда (через 12-14 часов после начала ИМ)
* недостаточности функции сердечно-сосудистой и легочной систем
* гемолитической анемии
* воспалительных заболеваний печени (особенно острых форм)
* повреждении мышц

**Нормальные значения:** ЛДГ общ 120-240 МЕ/л, ЛДГ1 15-120 МЕ/л

**Метод определения активности ЛДГ:** UV-кинетика.

**Принцип метода:** метод основан на способности ЛДГ катализировать реакцию образования лактата из пирувата при участии кофермента НАДН2. Скорость окисления НАДН2 в ходе второй реакции определяется по уменьшению оптической плотности реакционной среды при 340 нм и пропорциональна активности ЛДГ.

**Состав набора**: буферный раствор - 50 мл, лиофилизат, содержащий фермент-субстратную смесь – 10 фл. Перед применением растворить лиофилизат одного флакона в 10 мл буферного раствора,предварительно прогрев реактивы до комнатной температуры.



**Материал для исследования:** свежая негемолизированная сыворотка или плазма, свободная от гемолиза и липемии.

**Время взятия**: с 7 до 9 ч утра, при экстренных случаях – в любое время дня.

**Подготовка пациента**: взятие крови проводится натощак, исключить физические нагрузки не менее, чем за 3 дня до исследования, пункции,пальпации и другие манипуляции. Исключить прием алкоголя не менее, чем за 1 сутки до взятия крови.

**Методика взятия**: пациент находится в положении сидя или лежа, натощат. Исключить длительный венозный стаз – наложение жгута не более 30с. Кровь берут в вакунтейнер из стекла.

**Условия доставки**: в рамках программы для экстренных анализов исследование КК рекомендуется проводить не позднее чем через15 минут после поступления крови в лабораторию.

**Примечание:** У новорожденных активность ЛДГ выше, чем у взрослых. С возрастом активность постепенно снижается к 20 годам, увеличение наблюдается после 70 лет. Значительное увеличение наблюдается при ожирении, при физической нагрузке. Гемолиз, даже незначительный, вызывает резкое завышение активности ЛДГ.

**3. Самостоятельная работа:**

**Задания для самостоятельной работы:**

1. Перепишите в тетрадь принцип и нормы
2. Оборудуйте рабочее место для практической работы.
3. Выполните практическую работу.
4. Заполните бланк анализа. Оцените полученные результаты.
5. Сделайте вывод по работе.
6. Заполните таблицу:

Особенности преаналитического этапа определения активности ферментов

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Показатель** | **ЛДГ** | **КФК** | **ЩФ,КФ** | **АсТ, АлТ** | **Амилаза** |
| Материал исследования |  |  |  |  |  |
| Подготовка пациента |  |  |  |  |  |
| Методика взятия |  |  |  |  |  |
| Причины не патологического повышения активности Е |  |  |  |  |  |

**Решите ситуационные задачи:**

**Задача № 1.**

Пациент Е. находится на обследовании в кардиологическом отделении. Из клинико-диагностической лаборатории получены следующие результаты биохимического исследования сыворотки крови:

**Лабораторный анализ:**

* ЛДГобщ – 430 МЕ/л
* ЛДГ1 – 270 МЕ/л
* КФКобщ – 220 МЕ/л
* КФК2 – 150 МЕ/л
* АсАТ – 130 МЕ/л
* С-реактивный белок – 10мг/л

1. Напишите уравнение реакции, которую катализирует лактатдегидрогеназа.
2. Назовите изоферменты лактатдегидрогеназы и их локализацию в тканях организма человека.
3. Назовите метод разделения изоферментов на фракции
4. Оцените полученные результаты биохимических исследований у обследуемого пациента.
5. Сделайте заключение о возможной патологии у обследуемого пациента.

**Задача 2.**

При биохимическом исследовании активности ГГТ в сыворотки крови больных получены следующие результаты: 147 МЕ/л, 40 МЕ/л, 600 МЕ/л.

1. Оцените результаты исследования.

2. Какова возможная причина изменения активности фермента?

3. Укажите место локализации ГГТ, ее биологическое действие, условия для оптимального действия.

**Задача 3.**

В инфекционное отделение поступил мужчина, 55 лет, с болью в правом подреберье и желтушностью кожных покровов. Лабораторный анализ сыворотки крови показал:

- ЩФ - 200 МЕ/л

- ГГТ – 500 МЕ/л

- ЛДГобщ – 550 МЕ/л

- АсТ – 60 МЕ/л

- АлТ – 290 МЕ/л

1. Оцените результаты исследования.
2. Определите коэффициент де Ритиса – АсТ/АлТ, оцените его значение.
3. Укажите класс АлТ, АсТ, ГГТ.
4. Укажите изоферменты ЛДГ и место их локализации.
5. Сделайте заключение о возможной патологии, ответ поясните.
6. Укажите основные причины развития данного заболевания. Расскажите о профилактике данного заболевания.

**Задача 4.**

В хирургию поступил мужчина, 75 лет, с жалобами на затрудненное мочеиспускание. Лабораторный анализ сыворотки крови показал:

**Лабораторный анализ:**

- КФ – 260 МЕ/л

- АсТ – 30 МЕ/л

- АлТ – 32 МЕ/л

- ЩФ – 120 МЕ/л

1. Оцените результаты исследования.
2. Определите коэффициент де Ритиса – АсТ/АлТ, оцените его значение.
3. Укажите изоферменты КФ и их локализацию.
4. Сделайте заключение о возможной патологии, ответ поясните.

# ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 8 ИТОГОВОЕ ЗАНЯТИЕ ПО ТЕМЕ «ФЕРМЕНТЫ».

**Значение темы**: В организме практически нет реакций, которые не катализировались бы ферментами. Ферменты обеспечивают существование таких важнейших процессов жизнедеятельности, как реализация наследственной информации, биоэнергетика, синтез и распад биологических молекул. Наука о питании основана на точных знаниях о расщеплении веществ под влиянием ферментов пищеварительного тракта. Действие многих лекарственных препаратов основано главным образом на взаимодействии с ферментами. Многие проблемы наследственной патологии человека тесно связаны с дефектами или полным отсутствием синтеза специфических ферментов. Проблемы клеточного роста и развития, дифференцировки, физиологических функций (движение, перемещение в пространстве, транспорт веществ, процессы возбуждения и торможения) определяются в большей степени работой ферментов. Все вышеперечисленное позволяет считать данную тему основой для изучения всех последующих тем.

На основе теоретических знаний и практических умений обучающийся должен

**знать**:

* классификацию ферментов по сложности строения молекулы и типу катализируемой реакции;
* свойства ферментов;
* механизм действия ферментов;
* регуляцию активности ферментов;
* понятие «изоферменты»;
* строение и органная локализация изоферментов;
* требования к ферментам в энзимодиагностике;
* клинико-диагностическое значение определения активности ферментов;
* понятие «энзимопатии»: наследственные (первичные) и приобретенные (вторичные);

**уметь:**

* подготавливать, доставлять и хранить биологический материал для исследования активности ферментов;
* работать с фотометром.
* определять активность амилазы, АлТ, АсТ, ЩФ, ЛДГ, КФК унифицированным кинетическим методом и по «конечной точке» в биологических жидкостях организма человека;
* рассчитывать результаты исследования по эталонному раствору и калибровочному графику;
* оценивать результаты исследований и интерпретировать их;
* заполнять бланки исследований.

Студент должен овладеть **общими компетенциями**:

OK 1. Понимать сущность и социальную значимость своей будущей профессии, проявлять к ней устойчивый интерес.

ОК 2. Организовывать собственную деятельность, определять методы и способы выполнения профессиональных задач, оценивать их эффективность и качество.

ОК 3. Решать проблемы, оценивать риски и принимать решения в нестандартных ситуациях.

ОК 8. амостоятельно определять задачи профессионального и личностного развития, заниматься самообразованием, осознанно планировать повышение квалификации.

ОК 13. Организовывать рабочее место с соблюдением требований охраны труда, производственной санитарии, инфекционной и противопожарной безопасности.

Студент должен овладеть **профессиональными компетенциями**

ПК 3.1. Готовить рабочее место для проведения лабораторных биохимических исследований.

ПК 3.2. Проводить лабораторные биохимические исследования биологических материалов; участвовать в контроле качества.

ПК 3.3. Регистрировать результаты биохимических исследований.

ПК 3.4. Проводить утилизацию отработанного материала, дезинфекцию и стерилизацию использованной лабораторной посуды, инструментария, средств защиты

**План изучения темы:**

**1.Контроль исходного уровня знаний.**

Тестирование по вариантам.

**2. Самостоятельная работа.**

**Задания для самостоятельной работы:**

Работа по индивидуальным карточкам:

1.определение активности фермента

2. решение ситуационной задачи

3. ответ на теоретический вопрос.

**3. Подведение итогов.**

**4. Домашнее задание:** лекция Переваривание углеводов.

**ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 10 ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ГЛЮКОЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ.**

**Значение темы:** углеводы являются одним из основных источников энергии для организма, а также важным компонентом многих внутриклеточных и внеклеточных структур, из углеводов могут образовываться заменимые аминокислоты и жиры. Нарушения в обмене углеводов приводят к таким заболеваниям как гликогенозы, галактоземия, фруктозурия. Знание гормональной регуляции обмена углеводов в целом и уровня глюкозы в крови, в частности, необходимо для правильной диагностики таких заболеваний как сахарный диабет, панкреатит и других.

Для выявления нарушений углеводного обмена пользуются определением уровня глюкозы в крови натощак или через определенные промежутки времени после введения в организм углеводов. Для этого можно использовать различные методы, но ферментативный или глюкозооксидазный (назван так по ферменту) является наиболее точным, т.к. ферменты обладают специфичностью действия. В данной работе необходимо строго соблюдать все принципы ферментативных исследований.

На основе теоретических знаний и практических умений обучающийся должен **знать**:

- строение, свойства, классификацию углеводов,

- этапы обмена углеводов;

- переваривание и всасывание углеводов в ЖКТ;

- преаналитический этап исследования углеводов.

**уметь:**

* получать плазму и сыворотку из венозной крови;
* определять концентрацию глюкозы в различных биологических жидкостях;
* оценивать результаты исследований и интерпретировать их;
* заполнять бланк анализа.

Студент должен овладеть **общими компетенциями**:

ОК 2. Организовывать собственную деятельность, определять методы и способы выполнения профессиональных задач, оценивать их эффективность и качество.

ОК 6. Работать в коллективе и команде, эффективно общаться с коллегами, руководством, потребителями.

ОК 13. Организовывать рабочее место с соблюдением требований охраны труда, производственной санитарии, инфекционной и противопожарной безопасности.

Студент должен овладеть **профессиональными компетенциями**

ПК 3.1. Готовить рабочее место для проведения лабораторных биохимических исследований.

ПК 3.2. Проводить лабораторные биохимические исследования биологических материалов; участвовать в контроле качества.

ПК 3.3. Регистрировать результаты биохимических исследований.

ПК 3.4. Проводить утилизацию отработанного материала, дезинфекцию и стерилизацию использованной лабораторной посуды, инструментария, средств защиты.

**План изучения темы:**

**1.Контроль исходного уровня знаний**

Ответьте на вопросы:

1. Дайте определение углеводам. Какие функции они выполняют в организме?
2. Классификация углеводов.
3. Свойства углеводов.
4. Перечислите основные ферменты ЖКТ, рН и механизм их действия.
5. Особенности переваривания клетчатки.
6. Особенности всасывании углеводов в организме человека.
7. Норма глюкозы в крови, моче и эритроцитах.
8. Методы исследования углеводного обмена.
9. Особенности подготовки материала и посуды для исследования углеводного обмена

**2. Содержание темы**

**Глюкоза** – гексоза, основной представитель углеводов. Главный энергетический субстрат организма. Уровень глюкозы в крови регулируется деятельностью нейроэндокринной системы и паренхиматозных органов (печень, почки)

**Методы исследования углеводного обмена**

Основным показателем углеводного обмена является глюкоза, ее исследуют многими методами, основными из которых являются:

1. Редуктометрические методы: основаны на восстановительных свойствах глюкозы, определяют глюкозу в моче с реактивом Гайнеса-Акимова (этот метод почти не используется, так как не является специфичным).
2. Колориметрические методы: основаны способности глюкозы образовывать окрашенные соединения. К ним относится ортотолуидиновый метод (не используется, так как является токсичным).
3. Ферментативные методы: определение глюкозы по реакциям со специфическими ферментами. В основном используют глюкозооксидный и гексокиназный методы. Гексокиназный метод является наиболее точным для определения уровня глюкозы.
4. Экспресс-методы: использование диагностических тест-полосок для полуколичественного определения уровня глюкозы в крови и моче.
5. Использование автоматических и полуавтоматических анализаторов: «Эзискан», карманные глюкометры.

**Норма содержания глюкозы** в цельной крови: 3,3 – 5,5 ммоль/л.

Норма глюкозы в сыворотке крови: 3,7 – 6,1 ммоль/л.

В моче глюкоза отсутствует.

**Клинико-диагностическое значение обнаружения глюкозы в крови.**

**Гипергликемия -** увеличение уровня глюкозы в крови,может быть:

Инсулярная гипергликемия – причиной может быть поражение паренхимы поджелудочной железы или гипофункция бета-клеток островков Лангерганса, при которых снижается уровень выработки инсулина.

Экстраинсулярная – не связана с выработкой инсулина, подразделяется на:

* Физиологическую – причина прием углеводной пищи (алиментарная) или различные эмоциональные состояния, при которых возрастает уровень адреналина (нейрогенная).
* Патологическая – причинами могут быть заболевания желез внутренней секреции (опухоли передней доли гипофиза, надпочечников, тиреотоксикоз и т.д.), токсикозы различного происхождения, травмы, опухоли мозга, снижение обмена глюкозы при наркозе, воспалениях, септических состояниях, вследствие нарушения функций ферментативных систем.

**Гипергликемия** встречается при следующих заболеваниях:

* Сахарный диабет
* поражениях ЦНС, печени, желез внутренней секреции
* стрессовых ситуациях
* обильном приеме углеводной пищи
* приеме некоторых лекарственных средств (кофеин, стрихнин, адреналин, эфир, опий, морфий, хлороформ и т.д.).

**Гипогликемия -** уменьшение уровня глюкозы в крови, встречается при:

* Снижении гормональной функции щитовидной железы, надпочечников, гипофиза.
* Увеличение функций инсулярного аппарата поджелудочной железы.
* Некоторые формы поражения почек (нефриты, нефрозы).
* Некоторые формы поражения печени (гепатиты, жировая инфильтрация печени).
* Гликогенозы.
* Некоторые формы поражения тонкого кишечника, удаление значительной части желудка.

**Метод определения глюкозы в сыворотке крови** ферментативный (глюкозооксидазный) по конечной точке.



**Состав набора:** Реагент 1: Буфер – 200 мл. Реагент 2: Ферменты, лиофилизат – 2 фл. Калибратор (калибровочный раствор глюкозы 10 ммоль/л) – 5 мл. Перед исследованием растворить 1 флакон лиофилизата в одном флаконе буферного раствора (в100 мл), выдержать 15 минут при комнатеной температуре.

**Принцип метода:** D-глюкоза под действием фермента глюкозооксидазы (GOD) окисляется с образованием эквимолярного количества перекиси водорода. Образующаяся перекись водорода (Н2О2) при участии фермента пероксидазы способствует окислительному азосочетанию аминоантипирина и фенола с образованием окрашенного соединения розового цвета (хинониминовый краситель). Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна содержанию глюкозы в исследуемом материале и определяется фотометрически при длине волны 500 (490-540) нм.

**Материал исследования:** исследование глюкозы проводят в цельной крови (капиллярной и венозной), сыворотке, плазме, моче. При заборе, хранении и транспортировке биологического материала нужно соблюдать ряд общих требований.

**Подготовка обследуемых:**

* Забор крови делают утром с 7 до 9 часов утра. В экстренных случаях взятие крови осуществляется в любое время дня.
* Кровь берут натощак, после 8-12-часового голодания.
* Воздержание от приема алкогольных напитков не менее 24 часов.
* Исключается физическое напряжение и эмоциональное возбуждение, для чего дают обследуемому отдохнуть 15 минут.

**Получение и хранение биологического материала:**

* Капиллярную кровь исследуют сразу же после забора материала.
* Для получения цельной крови или плазмы венозную кровь собирают в вакунтейнер с антикоагулянтом (соли ЭДТА, гепарин, гепаринат лития, натрия или аммония), стабилизатором или ингибиторолм гликолиза. В качестве ингибиторов гликолиза используют фторид натрия или калия. Соотношение кровь : антикоагулянт : стабилизатор = 1 мл : 2 мг: 2,5 мг. Центрифугирование проводят в обычном режиме.
* Для получения сыворотки крови венозную кровь собирают в чистую, сухую пробирку со стабилизатором гликолиза. Центрифугирование проводят в обычном режиме.

**Условия хранения биологического материала:**

* Биологический материал хранят в хорошо закрытых контейнерах.
* Капиллярную кровь хранят 1 час. Исследования проводят в течение 10 минут от забора материала (после 10 минут отмечается снижение уровня глюкозы).
* Плазму и сыворотку отделяют от форменных элементов не позднее 30 минут после забора материала. Плазму и сыворотку можно хранить 12 часов в холодильнике при температуре 4-8 С. При использовании ингибиторов гликолиза хранить можно: 1 день при комнатной температуре, 7 дней при 4-8 С, 1 месяц при –20 С.

**Примечания:**

* Концентрация глюкозы в венозной крови на 10% меньше, чем в капиллярной. Концентрация глюкозы в сыворотке и плазме на 10-13% выше, чем в цельной крови.
* Антикоагулянт цитрат натрия мешает определению глюкозы.
* Повышение глюкозы в крови вызывают следующие факторы: курение, голодание, стресс, прием пищи, кофе, гипертермия, диета с низким содержанием жиров, ожирение, беременность, физические нагрузки, некоторые лекарственные препараты (кофеин, эстрогены, пероральные контрацептивы, диуретики).
* Понижение уровня глюкозы в крови вызывает прием алкоголя в больших дозах, длительное пребывание в положении лежа, тепловой стресс, лихорадка, очень тяжелые физические упражнения, сезонное снижение весной, некоторые лекарственные препараты (анаболические стероиды, ацетилсалициловая кислота, антигистаминные препараты).

**3. Самостоятельная работа**

**Задания для самостоятельной работы:**

1. Ознакомьтесь с принципом метода и нормами глюкозы в крови и мочи.
2. Оборудуйте рабочее место для практической работы.
3. Выполните практическую работу по определению уровня глюкозы в сыворотки крови.
4. Заполните бланк анализа. Оцените полученные результаты.
5. Сделайте вывод по работе.
6. Ответьте на дополнительные вопросы.
7. Заполните предложенную таблицу

**Переваривание углеводов**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Отдел ЖКТ** | **Ферменты, расщепляющие углеводы, рН.** | **Характеристика переваривания.**  **Конечные продукты.** |
| Ротовая полость. |  |  |
| Желудок. |  |  |
| ДПК |  |  |
| Тонкий кишечник: |  |  |
| Толстый кишечник. |  |  |

**Ответьте на вопросы:**

1. Перечислите основные классы углеводов и укажите их представителей.
2. Почему основным показателем обмена углеводов является глюкоза?
3. Для диагностики каких патологий назначается анализ глюкозы в крови?
4. Укажите физиологические причины гипергликемии.
5. Какой из известных методов определения глюкозы является наиболее специфичным? Почему вы так считаете?
6. Отличается ли содержание глюкозы в крови у детей и взрослых?

**4. Итоговый контроль знаний.**

Тестирование.

**5. Домашнее задание:** лекция Переваривание и всасывание углеводов.

**ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 11 ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЛАКТАТА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ.**

**Значение темы**: Анаэробный гликолиз вызывает заметное увеличение содержания лактата в крови. особенно явно происходит при длительных нагрузках. Общая причина увеличения содержания молочной кислоты в крови– кислородное голодание, которое может возникнуть при шоке, пневмонии, острой сердечное недостаточности. Лактацидоз наблюдается также при острой почечной недостаточности и лейкемии. Измерение концентрации лактата позволяет оценить кислотно-основное состояние и используется для диагностики и лечения лакацидоза.

На основе теоретических знаний и практических умений обучающийся должен **знать**:

- этапы обмена углеводов;

- промежуточный обмен углеводов;

- гормональную регуляцию обмена углеводов;

- роль ЦНС и печени в обмене углеводов;

- клинико-диагностическое значение определения концентрации лактата в биологических жидкостях

**уметь:**

* получать плазму и сыворотку из венозной крови;
* определять содержание лактата в крови;
* оценивать результаты исследований и интерпретировать их;
* заполнять бланк анализа

Студент должен овладеть **общими компетенциями**:

ОК 2. Организовывать собственную деятельность, определять методы и способы выполнения профессиональных задач, оценивать их эффективность и качество.

ОК 6. Работать в коллективе и команде, эффективно общаться с коллегами, руководством, потребителями.

ОК 7. Ставить цели, мотивировать деятельность подчиненных, организовывать и контролировать их работу с принятием на себя ответственности за результат выполнения заданий.

ОК 9. Быть готовым к смене технологий в профессиональной деятельности.

ОК 13. Организовывать рабочее место с соблюдением требований охраны труда, производственной санитарии, инфекционной и противопожарной безопасности.

OK 14. Вести здоровый образ жизни, заниматься физической культурой и спортом для укрепления здоровья, достижения жизненных и профессиональных целей.

Студент должен овладеть **профессиональными компетенциями**

ПК 3.1. Готовить рабочее место для проведения лабораторных биохимических исследований.

ПК 3.2. Проводить лабораторные биохимические исследования биологических материалов; участвовать в контроле качества.

ПК 3.3. Регистрировать результаты биохимических исследований.

ПК 3.4. Проводить утилизацию отработанного материала, дезинфекцию и стерилизацию использованной лабораторной посуды, инструментария, средств защиты.

**План изучения темы:**

**1.Контроль исходного уровня знаний.**

Ответьте на вопросы:

1. Норма глюкозы в крови, моче и эритроцитах.
2. Промежуточный обмен углеводов: перечислить этапы.
3. Изомеризация углеводов в печени.
4. Образование активной формы глюкозы.
5. Анаэробный путь окисления глюкозы.
6. Анаэробный путь окисления глюкозы.
7. Процессы гликогенолиза и гликолиза.
8. Как используются организмом продукты гликолиза.
9. Расскажите о путях образования гликогена в организме.
10. Расскажите о сути процесса глюконеогенеза.
11. Промежуточные продукты гликолиза.
12. Методы и особенности исследования углеводного обмена.

**2. Содержание темы**

Молочная кислота (лактат), является конечным продуктом гликолиза и гликогенолиза, образуется в организме в результате восстановления пировиноградной кислоты (пирувата) в анаэробных условиях. В свою очередь, пируват накапливается в тканях в процессе распада глюкозы, гликогена и ряда аминокислот. При физической нагрузке лактат выходит из мышц, превращается в пируват в печени или метаболизируется мозговой тканью и сердцем.

**Нормальные значения лактата: 0,5 – 2,2 ммоль/л**

**Клинико-диагностическое значение определения лактата**

Анаэробный гликолиз вызывает заметное увеличение содержания лактата в крови. Особенно явно происходит при длительных нагрузках.

Общая причина увеличения содержания молочной кислоты в крови **гиперлактатемии** – кислородное голодание, которое может возникнуть при:

* сахарном диабете;
* большой физической нагрузке у спортсменов;
* острых отравлениях;
* шоке;
* пневмонии,
* острой сердечное недостаточности
* острой почечной недостаточности
* лейкемии.

Измерение концентрации лактата позволяет оценить кислотно-основное состояние и используется для диагностики и лечения лакацидоза.

**Метод определения лактата в сыворотке крови:** энзиматический, реакция Триндера; по конечной точке.

Сущность **колориметрических методов по конечной точке** заключается в следующем**:**

1. На первом этапе аналит с помощью ферментативной реакции или цепи реакций превращают в продукт, который можно определить колориметрическим методом.

2.На втором этапе этот продукт взаимодействует с хромогенным комплексом, в результате образуется окрашенное соединение, которое фотометрируют; интенсивность его окраски пропорциональна концентрации аналита в биологической жидкости.

Необходимо отметить, что все реакции как первого, так и второго этапов должны во время инкубации обеспечить полное превращение субстратов в продукты, т. е. кинетика всех реакций должна выходить на плато (доходить до конца), отсюда название «по конечной точке».

Чтобы все реакции проходили до конца, необходимо очень аккуратно и точно соблюдать условия инкубации, указанные в инструкциях к используемому набору реагентов (рН, температуру, время реакции и т. д.).



**Принцип определения лактата:** определение основано на проведении сопряжённых реакций, катализируемых лактатоксидазой и пероксидазой. Молочная кислота под действием фермента лактатоксидазы окисляется до аллантоина, перекиси водорода и двуокиси углерода. Образующаяся в данной реакции перекись водорода при участии фермента пероксидазы способствует окислительному азосочетанию хлорфенола и 4-аминоантипирина с образованием окрашенного соединения (хинонимин). Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна содержанию молочной кислоты в пробе и определяется фотометрически при длине волны 500 нм (490 – 520 нм).

**Материал для исследования:** плазма (полученная со фторидом натрия), спинномозговая жидкость, сыворотку использовать нельзя. Стабильность материала при 200 С – 2 часа.

**Время взятия**: с 7 до 9 ч утра, при экстренных случаях – в любое время дня.

**Подготовка пациента**: кровь берется натощак, в состоянии покоя, веностаз не должен превышать 30 секунд, использование жгута не рекомендуется. Исключить прием алкоголя не менее, чем за 1 сутки до взятия крови и физические нагрузки за 3 дня, прием лекарств.

**Методика взятия**: пациент находится в положении сидя или лежа. Исключить длительный венозный стаз – наложение жгута не более 30с. Кровь берут в вакунтейнер. Для получение плазмы используют – ЭДТА и фторид натрия, другие антикоагулянты непригодны. В результате внутриклеточного гликолиза, концентрация лактата в пробе может быстро увеличиваться. Поэтому необходимо сразу выполнить отделение форменных элементов. Кровь должна хранится на льду, отделение плазмы в течение 15 минут после взятия крови.

**Примечание:** Уровень лактата возрастает при физической нагрузке, и возвращается в норму через 30 минут.

**3. Самостоятельная работа**

**Задания для самостоятельной работы:**

1. Ознакомьтесь с принципом метода определения лактата и нормой в крови.
2. Оборудуйте рабочее место для практической работы.
3. Выполните практическую работу по определению содержания лактата в сыворотке крови.
4. Заполните бланк анализа. Оцените полученные результаты.
5. Сделайте вывод по работе.
6. Ответьте на дополнительные вопросы.
7. Заполните предложенную таблицу.
8. Решите ситуационные задачи.

**Ответьте на вопросы:**

1. Какие вещества относятся к дисахаридам, укажите их состав?
2. Какие функции выполняют в организме олигосахариды?
3. Почему при кислородном голодании образуется много лактата, чем это грозит организму?
4. Изучив сущность колориметрических методов по конечной точке, назовите что будет являться продуктами 1 и 2 этапа определения лактата предложенным методом.
5. Напишите определения следующим терминам:

* глюкоза
* гликоген
* изомеризация углеводов
* фосфорилирование глюкозы
* гликогенез
* гликогенолиз
* гликолиз
* гипергликемия
* гипогликемия
* глюкогон
* глюконеогенез
* гликогенсинтетаза

**Заполните таблицу:**

Характеристика этапов промежуточного обмена глюкозы

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Показатель характеристики** | **Фосфори-лирование** | **Глико-**  **генез** | **Глико-генолиз** | **Глюко-неогенез** | **Гликолиз** | | |
| **анаэробный** | **аэробный** | |
| **прямой** | **непрямой** |
| Определение |  |  |  |  |  |  |  |
| Локализация |  |  |  |  |  |  |  |
| Исходное вещество |  |  |  |  |  |  |  |
| Промежуточные продукты |  |  |  |  |  |  |  |
| Конечные продукты |  |  |  |  |  |  |  |
| Количество АТФ (образовавшихся или затраченных) |  |  |  |  |  |  |  |

**Решите задачи:**

**Задача № 1.**

Больной Петров, 45 лет, из гематологического отделения (1 эт.) был направлен в лабораторию для определения сахара в крови (на 3 эт. др. корпуса). Больной Петров лабораторию не нашел и вернулся в отделение.

Медсестра выразила ему в резкой форме свое недовольство и попросила больного Сидорова отвести его в лабораторию. По дороге они бурно обсуждали современную молодежь в лице медсестры отделения.

Лаборант отнеслась к больному с сочувствием, без очереди пригласила его в кабинет и взяла у него кровь на сахар.

На следующее утро врач ознакомился с результатом анализа больного Петрова и не поверил данным. Выяснив обстоятельство у больного, когда и как он сдал кровь на анализ, врач сделал серьезное замечание постовой медсестре и лаборанту.

1. Кто из медперсонала совершил ошибку? Оцените действия врача, медсестры и лаборанта. Обоснуйте свое мнение.

2. Расскажите о правилах подготовке больного для данного исследования.

3. Какие условия получения и хранения биологического материала нужно соблюдать при исследовании уровня глюкозы в сыворотке крови?

**Задача № 2.**

Врач ведет обследование спортсменов перед ответственными соревнованиями. После тяжелой 3 часовой тренировки в крови спортсмена Иванова и спортсмена Семенова обнаружено 5,0 ммоль/л молочной кислоты у каждого. Через час после окончания тренировки в крови у спортсмена Иванова концентрация молочной кислоты снизилась до 2,0 ммоль/л, а в крови у спортсмена Семенова – снизилась до 4,3 ммоль/л.

Спортсмен Семенов к соревнованиям допущен не был. Ему было предложено пройти дополнительное обследование.

* 1. Почему не допустили спортсмена к соревнованиям?
  2. Расскажите об образовании молочной кислоты в организме и её дальнейшем использовании.
  3. Какую патологию можно предположить у спортсмена

**4. Итоговый контроль знаний.**

Тестирование.

**6. Домашнее задание:** лекция Промежуточный обмен глюкозы. Регуляция обмена глюкозы.

**ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ №12 ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ГЛИКИРОВАННОГО НВ И ФРУКТОЗАМИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ**

**Значение темы:**  это лабораторный тест долговременного контроля за уровнем глюкозы в крови. Около 5-8% гемоглобина, находящегося в эиртроцитах, присоединяют молекулы глюкозы, такие молекулы гемоглобина называют гликозилированный. Степень гликозилирования Нв зависит от концентрации глюкозы, которая сохраняется в эритроцитах на протяжении всей их 120-дневной жизни. Поэтому процент гликозилированного Нв отражает средний уровень глюкозы в течение предшествующих 2 месяцев, что позволяет осуществлять точный контроль за содержанием глюкозы в крови между визитами больного к врачу, чем выше гликозилированный Нв, тем хуже контролировался уровень глюкозы в крови. Гликозилиованный Нв – НвА1.

Определение гликозилированного гемоглобина проводят для ранней диагностики сахарного диабета, особенно при массовых обследованиях населения на скрытые формы диабета, а также для ретроспективной оценки степени декомпенсации данного заболевания за последние три месяца для улучшения контроля за эффективностью лечения сахарного диабета. Похожим тестом является определение Фруктозамина в сыворотке, это гликированный белок, отражающий средний уровень глюкозы в крови за последние 2-3 недели.

На основе теоретических знаний и практических умений обучающийся должен

**знать**:

- пути нарушения обмена углеводов в организме человека;

- классификацию, биохимические нарушения, лабораторную диагностику сахарного диабета;

- клинико-диагностическое значение определения концентрации гликированного гемоглобина и фруктохамина в биологических жидкостях

**уметь:**

* получать плазму и сыворотку из венозной крови;
* определять концентрацию гликированного гемоглобина в крови.
* оценивать результаты исследований и интерпретировать их;
* заполнять бланк анализа.

Студент должен овладеть **общими компетенциями**:

ОК 2. Организовывать собственную деятельность, определять методы и способы выполнения профессиональных задач, оценивать их эффективность и качество.

ОК 9. Быть готовым к смене технологий в профессиональной деятельности.

ОК 10. Бережно относиться к историческому наследию и культурным традициям народа, уважать социальные, культурные и религиозные различия.

ОК 13. Организовывать рабочее место с соблюдением требований охраны труда, производственной санитарии, инфекционной и противопожарной безопасности.

Студент должен овладеть **профессиональными компетенциями**

ПК 3.1. Готовить рабочее место для проведения лабораторных биохимических исследований.

ПК 3.2. Проводить лабораторные биохимические исследования биологических материалов; участвовать в контроле качества.

ПК 3.3. Регистрировать результаты биохимических исследований.

ПК 3.4. Проводить утилизацию отработанного материала, дезинфекцию и стерилизацию использованной лабораторной посуды, инструментария, средств защиты.

**План изучения темы:**

**1.Контроль исходного уровня знаний.**

Ответьте на вопросы:

1. Норма глюкозы в крови, моче и эритроцитах.
2. Норма глюкозы в крови, моче и эритроцитах. Почечный порог глюкозы.
3. Роль печени и почек в углеводном обмене.
4. Основные факторы, регулирующие углеводный обмен.
5. Субстратная регуляция.
6. Нервная регуляция обмена углеводов.
7. Влияние и механизм действия инсулина.
8. Перечислить и описать действие контринсулярных гормонов.
9. Действие адреналина и глюкагона на углеводный обмен.
10. Действие глюкокортикоидов.
11. Гипогликемия - причины, клинические и лабораторные признаки.
12. Гипергликемия - причины, клинические и лабораторные признаки.
13. Виды гипершликемии.
14. Исследования углеводного обмена.

**2. Содержание темы.**

**Клинико-диагностическое значение определение**

**гликозилированного гемоглобина и фруктозамина.**

Гликозилированный гемоглобин НвА1с– гемоглобин, образующийся посттрансляционно, вследствие «нагрузки» обычного Нв глюкозой. Около 5-8% гемоглобина, находящегося в эиртроцитах, присоединяют молекулы глюкозы, такие молекулы гемоглобина называют гликозилированный. Степень гликозилирования Нв зависит от концентрации глюкозы, которая сохраняется в эритроцитах на протяжении всей их 120-дневной жизни. Поэтому процент гликозилированного Нв отражает средний уровень глюкозы в течение предшествующих 2 месяцев, что позволяет осуществлять точный контроль за содержанием глюкозы в крови между визитами больного к врачу, чем выше гликозилированный Нв, тем хуже контролировался уровень глюкозы в крови. Гликозилиованный Нв – НвА1с.

Определение гликозилированного гемоглобина проводят для ранней диагностики сахарного диабета, особенно при массовых обследованиях населения на скрытые формы диабета, а также для ретроспективной оценки степени декомпенсации данного заболевания за последние три месяца для улучшения контроля за эффективностью лечения сахарного диабета.

Фруктозамин в сыворотке, это гликированный белок, отражающий средний уровень глюкозы в крови за последние 2-3 недели.

Биологическим материалом для исследования служит цельная венозная кровь, берут с ЭДТА, до исследования держат на льду.

**Нормальное содержание:**

НвА1с –5,5 – 6.5% от общего Нв;

Оценка результатов: если НвА1 менее 6% - отсутствие существенных нарушений в регуляции углеводного обмена; 6-8% - хорошая регуляция;8-9% удовлетворительная регуляция; 9-12% плохая регуляция.

Фруктозамин – 118-282 мкмоль/л мужчины;

161 – 351 мкмоль/л женщины.

**3. Самостоятельная работа.**

**Заполните таблицы:**

**Регуляция углеводного обмена**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Показатель характеристики** | **Инсулин** | **Глюкагон** | **Адреналин** |
| Строение |  |  |  |
| Место синтеза |  |  |  |
| Механизм действия |  |  |  |
| Клетки мишени |  |  |  |
| Стимулы синтеза |  |  |  |
| Действие на организм:  - активирует  - ингибирует |  |  |  |

**Патология обмена углеводов.**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Виды изменений.** | **Классификация.** | **Причины.** | **Клинические признаки.** |
| Гипогликемия |  |  |  |
| Гипергликемия |  |  |  |
| Кетоацидоз. |  |  |  |

**Показатели углеводного обмена**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **показатель** | **Материал**  **исследования** | **норма** | **Метод определения** | **термин** | **патология** |
| **Глюкоза** |  |  |  |  |  |
| **лактата** |  |  |  |  |  |
| **Сиаловые кислоты** |  |  |  |  |  |
| **НвА1с** |  |  |  |  |  |

**Задания для самостоятельной работы:**

1. Ознакомьтесь с принципом и нормами
2. Оборудуйте рабочее место для практической работы.
3. Выполните практическую работу по определению содержания НвА1с
4. Сделайте необходимые расчеты.
5. Заполните бланк анализа. Оцените полученные результаты.
6. Сделайте вывод по работе.
7. Ответьте на дополнительные вопросы.

**Решите задачи:**

**Задача № 1.**

**А\** У грузчика во время тяжелой физической работы вдруг появились: острое чувство голода, дрожь всего тела; слабость; головокружение; тело покрылось мелким потом. Товарищ предложил ему конфету. И грузчик вскоре почувствовал себя лучше.

1. Дайте объяснение этой ситуации с точки зрения биохимика.

2. Расскажите о видах и причинах снижения уровня глюкозы в крови.

**Б\** После экзамена у студента уровень глюкозы в крови оказался равен 6,2 ммоль\л.

1. Является ли это признаком патологии?

2. Какие изменения в обмене углеводов происходят в организме студента перед экзаменом и после экзамена?

3. Какой вид гликемии наблюдается в данном случае?

4. Можно ли уменьшить уровень глюкозы у студента перед экзаменом без приема лекарственных препаратов?

**Задача № 2.**

Молодой человек, больной сахарным диабетом 1 типа, проходил диспансеризацию. По его словам за последнее время он хорошо себя чувствовал и не имел никаких клинических признаков сахарного диабета. Он не контролировал дома уровень глюкозурии и гликемии. Лабораторно выявлено:

- Глюкоза в крови (через 2 ч после завтрака) – 10 ммоль\л.

- Глюкоза в моче (утренняя проба) – 2 %.

- Гликированный гемоглобин 6,5 %.

1. Расскажите о гликированном гемоглобине и его значении в диагностике сахарного диабета.

2. Назовите нормальные показатели глюкозы в крови и моче и гликированного гемоглобина.

3. Объясните причины изменений лабораторных показателей в данном случае. сделайте заключение о ходе лечения данного больного.

**Задача № 3.**

Девушка 18 лет, больна сахарным диабетом 1 типа обратилась к участковому врачу в связи с ухудшением самочувствия и потерей веса. Её постоянно мучила жажда и полиурия. В моче был обнаружен сахар. Ей была рекомендована госпитализация на следующий день. Однако вечером у неё развилась слабость, тошнота, вялость. Ее госпитализировали по скорой помощи. При поступлении в клинику давление было 95\60, пульс 112\мин, холодные конечности. У нее развилось глубокое ускоренное дыхание (дыхание Кусммауля). Изо рта шел запах ацетона.

**Лабораторно выявлено:**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Сыворотка крови. | Ацетон | 410 мкмоль\л |
| в-оксимаслянная кислота | 2,1 ммоль\л |
| НвА1с | 9 % |
| Мочевина | 18 ммоль\л |
| Креатинин | 180 мкмоль\л |
| Глюкоза | 32 ммоль\л |
| Артериальная кровь. | рН | 7,05 |
| рСО2 | 15 мм .рт. ст. |

1.Назовите нормы данных лабораторных показателей.

2. Какой диагноз можно предположить? Обоснуйте свое мнение.

3. Какие виды диабетической комы вы знаете?

4. Какое лечение можно предложить в данном случае?

**Задача № 4.**

Проанализируйте результаты биохимических исследований крови.

**БИОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ**

Крови, плазмы, сыворотки, мочи, спинномозговой жидкости.

20 ноября 2003 г. Отделение - эндокринологическое

Ф. И. О. Павлов П. М. Возраст – 45 лет

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| № п/п | Наименование анализов | Результат | Норма |
| 1 | Глюкоза | 12.1 ммоль\л |  |
| 2 | Ацетон | 390 мкмоль\л |  |
| 3 | НвА1с | 8% |  |
| 4 | Мочевина | 11.2 ммоль\л |  |
| 5 | Креатинин | 145.3 мкмоль\л |  |
| 6 | Общий холестерин | 7.2 ммоль\л |  |
| 7 | рН крови | 7.33 |  |

1. Оцените результаты исследование.
2. Укажите локализацию патологического процесса.
3. Назовите ведущий показатель патологического процесса.
4. Укажите клинические признаки и причину заболевания.

**Ответьте на вопросы:**

1. Перечислите основные лабораторные исследования при сахарном диабете.
2. Чем опасна длительная гипергликемия?
3. Почему при длительной гипергликемии количество гликозилированного гемоглобина возрастает?
4. Чем опасно для организма человека увеличесние количества гликозилированного гемоглобина?
5. На клетках каких тканей имеются белки-рецепторы для взаимодействия:

а) с инсулином; б) с глюкагоном; в) адреналином; б) йодтиронинами?

1. Напишите схематично образование гликированных белков в крови.

**4. Итоговый контроль знаний.**

Тестирование.

**5. Подведение итогов.**

**6. Домашнее задание:** (1)

**ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 13 ГЛЮКОЗОТОЛЕРАНТНЫЙ ТЕСТ.**

**Значение темы**:Самым серьезным и распространенным заболеванием, связанным с нарушением углеводного обмена, является сахарный диабет. Поэтому диагностика, лечение и профилактика этого заболевания являются важным моментом в работе медицинского работника. Диагностируют сахарный диабет разными методами, один из них – тест толерантности к глюкозе ГТТ.

На основе теоретических знаний и практических умений обучающийся должен

**знать**:

- роль ЦНС и печени в обмене углеводов;

- пути нарушения обмена углеводов в организме человека;

- классификацию, биохимические нарушения, лабораторную диагностику сахарного диабета;

- клинико-диагностическое значение определения концентрации глюкозы в биологических жидкостях

**уметь:**

* получать капиллярную кровь;
* проводить ГТТ;
* оценивать результаты исследований и интерпретировать их;
* заполнять бланк анализа.

Студент должен овладеть **общими компетенциями**:

ОК 2. Организовывать собственную деятельность, определять методы и способы выполнения профессиональных задач, оценивать их эффективность и качество.

ОК 6. Работать в коллективе и команде, эффективно общаться с коллегами, руководством, потребителями.

ОК 12. Оказывать первую медицинскую помощь при неотложных состояниях.

ОК 13. Организовывать рабочее место с соблюдением требований охраны труда, производственной санитарии, инфекционной и противопожарной безопасности.

Студент должен овладеть **профессиональными компетенциями**

ПК 3.1. Готовить рабочее место для проведения лабораторных биохимических исследований.

ПК 3.2. Проводить лабораторные биохимические исследования биологических материалов; участвовать в контроле качества.

ПК 3.3. Регистрировать результаты биохимических исследований.

ПК 3.4. Проводить утилизацию отработанного материала, дезинфекцию и стерилизацию использованной лабораторной посуды, инструментария, средств защиты.

**План изучения темы:**

**1.Контроль исходного уровня знаний.**

Ответьте на вопросы:

1. Понятие о гипо- и гипергликемии, глюкозурии, кетонемии, кетонурии.
2. Причины и виды сахарного диабета.
3. Биохимические изменения при сахарном диабете.
4. Влияние сахарного диабета на другие обмены веществ.
5. Лабораторная диагностика сахарного диабета.
6. Лечение сахарного диабета.
7. Лабораторные и клинические признаки гипо- и гипергликемического шока.
8. Профилактика сахарного диабета.

**2. Содержание темы.**

В случаях потенциального, латентного сахарного диабета с асимптоматческим его течением уровень глюкозы в крови обычно не выходит за пределы физиологических колебаний, но может повышаться под влиянием психической и физиологической травмы, интоксикации и беременности. Для подтверждения диагноза прибегают к постановке теста толерантности к глюкозе. про

**Факторы, влияющие на результаты ГТТ:**

* Характер питания.
* Характер труда.
* Курение.
* Беременность.
* Гормональные нарушения.

В связи с этим были разработаны следующие рекомендации по проведению преаналитического этапа ГТТ:

1. Обследуемый на протяжении трех дней не должен менять привычного режима питания и работы.
2. За 3 дня отменяются инъекции глюкозы, кофеина, адреналина.
3. Последний прием пищи должен быть не позднее, чем в 20 часов вечера накануне обследования.
4. Перед проведением теста необходимо 30 минут спокойно посидеть.
5. Во время пробы нельзя курить, нервничать, заниматься физической работой и принимать лекарственные препараты.

**Анализ гликемических кривых.**

Кривая здорового человека отличается быстрым подъемом, максимальный подъем отмечается через 30 минут после приема глюкозы. Количество глюкозы в крови может при этом удвоится, но не повышается более 10 ммоль/л.

При сахарной болезни уровень сахара в крови возрастает дольше и достигает максимума через 30-60 минут или еще позднее, причем достигает очень высоких цифр – 14 ммоль/ л глюкозы крови и более.

Понижение гликемической кривой (уменьшение глюкозы в крови) у здорового человека наступает быстро и через 1,5-2,5 часа возвращается к исходной величине, а иногда оказывается ниже её.

При диабете повышение глюкозы в крови держится 5-7 часов и возвращается к исходной величине очень медленно. При сахарном диабете происходит снижение толерантности к глюкозе.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Глюкоза натощак | Глюкоза через 1 час | Глюкоза через 2 часа | Глюкозурия |
| Норма | Менее 6,5 | Менее 10 | Менее 6,5 | Нет |
| Сомнительный результат | Менее 6,5 | Менее 11 | Менее 8,3 | Нет |
| Латентный диабет | Менее 7.0 | Более 11 | Более 8,3 | Часто отсутствует |
| Явный диабет | Более 7.0 | Более 11 | Более 8,3 | Почти всегда есть |

Диагноз сахарный диабет ставят в тех случаях, когда гликемия натощак белее 7,0 ммоль/л и через 2 часа после нагрузки более 11 ммоль/л.

**3. Самостоятельная работа.**

**Заполните таблицы:**

**Основные признаки сахарного диабета I и II типов**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Признак. | I тип (ИЗСД). | II тип (ИНСД). |
| 1. Возраст возникновения болезни |  |  |
| 2. Этиология. |  |  |
| 3. Развитие симптомов. |  |  |
| 4. Телосложение. |  |  |
| 5. Потеря веса при заболевании. |  |  |
| 6. Запах кетонов изо рта. |  |  |
| 7. Изменения в моче. |  |  |
| 8. Концентрация инсулина в плазме. |  |  |
| 10. Уровень глюкозы в крови и моче. |  |  |
| 11. Наследственность. |  |  |
| 12. Лечение (основное). |  |  |

**Дифференциальная диагностика гипер- и гипогликемической комы**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Основные показатели | Гипергликемическая кома | Гипогликемическая кома |
| Возраст |  |  |
| Причины. |  |  |
| Начало. |  |  |
| Диспепсические расстройства. |  |  |
| Особенности предкоматозного состояния. |  |  |
| Кожа. |  |  |
| Язык, полость рта. |  |  |
| Дыхание. |  |  |
| Сердечнососудистая система. |  |  |
| Мышечная система. |  |  |
| РН крови. |  |  |
| Диурез. |  |  |
| Гликемия. |  |  |
| Лечение. |  |  |

**Задания для самостоятельной работы:**

1. Ознакомьтесь с принципом и методикой проведения практической работы.
2. Провести ГТТ с однократной нагрузкой.
3. Зарисуйте схематично гликемические кривые в норме, при латентном и явном сахарном диабете.
4. Решите предложенные преподавателем задачи.
5. Ответьте на дополнительные вопросы.

**Принцип: в** ответ на поступление в организм углеводов, вырабатывается инсулин, который ограничивает повышение уровня глюкозы в крови. Если степень гипергликемии превосходит обычную, то говорят о снижении толерантности организма к глюкозе.

**Методика проведения ГТТ с однократной нагрузкой.**

1. Натощак берут кровь из пальца и определяют в ней содержание глюкозы унифицированным методом.
2. Затем дают выпить раствор 75 грамм глюкозы на 200 мл воды (1,75 г глюкозы на 1 кг веса), подкисленный лимонной кислотой.
3. Через 30, 60, 120, 180 минут после приема сахара определяют уровень глюкозы в крови.
4. Результаты вносят в таблицу и на их основании строят гликемические кривые, откладывая на оси абсцисс время забора крови, а на оси ординат – найденное содержание сахара в крови в ммоль/л.
5. При анализе гликемических кривых обращают внимание на следующие параметры:

* Начальное содержание глюкозы в крови.
* Быстроту и высоту подъема гликемической кривой.
* Продолжительность гипергликемии и характер её снижения.

**Ответьте на вопросы:**

1. На каком принципе основано проведение ГТТ.
2. Почему у здорового человека при проведении ГТТ с двойной нагрузкой второго пика гликемии чаще всего не бывает.
3. Постройте в тетради гликемические кривые характерные для нормы, сомнительного результата, латентного диабета и сахарного диабета.
4. Дайте определение понятиям: сахарный диабет, гликемические кривые, почечный порог для глюкозы, латентный диабет, нарушение толерантности к глюкозе.
5. \*Объясните, почему характер питания, труда и эмоциональное состояние могут влиять на результаты ГТТ.
6. Расскажите о преаналитическом этапе исследований обмена углеводов.

**Решите задачи:**

**Задача № 1.**

Симонова М.И., домохозяйка 25 лет, находится в состоянии тревоги по поводу того, что недавно у ее старшего брата был диагностирован диабет 2-го типа. Она читала, что имеется генетическая предрасположенность к диабету, поэтому решила определить сахар в моче при помощи диагностических полосок, используемых братом. Положительный результат убедил её в том, что, несмотря на хорошее самочувствие, она больна диабетом. Она пошла на прием к лечащему врачу, который назначил ей анализ крови на сахар.

Полученный результат, 6,2 ммоль/л (не натощак), укладывающийся в диапазон нормальных значений, не развеял опасений пациентки по поводу её заболевания сахарным диабетом. Проведенное в последующем дважды тестирование глюкозы в моче опять дало положительные результаты. Врач предложил Симоновой М. И. Провести ГТТ. Его результаты были таковы: уровень глюкозы натощак – 4,8 ммоль\л, а через 2 часа после сахарной нагрузки – 7, 5 ммоль\л.

1.Оправданы ли опасения пациентки о передачи по наследству предрасположенности к диабету?

2. Больна ли Симонова М.И. сахарным диабетом?

3. Почему, при нормальном уровне глюкозы в крови, у пациентки наблюдается глюкозурия?

**Задача № 2**

Вдова средних лет, проживающая одна, была госпитализирована после того, как сын обнаружил ее дома в полубессознательном состоянии. Он не видел ее в течение недели, но во время последней их встречи женщина чувствовала себя хорошо. При объективном обследовании обращала на себя внимание резкая дегидротация, но признаков кетоза не было. Дыхание было нормальным.

**Лабораторные данные в сыворотке крови:**

- Натрий – 149 ммоль\л.

- Калий - 4.7 ммоль\л.

- Бикарбонат – 18 ммоль\л.

- Мочевина – 35 ммоль\л.

- Креатинин – 180 мкмоль\л.

- Глюкоза – 54 ммоль\л.

- Общий белок – 90 г\л.

- Осмолярность – 370 ммоль\кг.

Пациентка впоследствии сообщила, что в течении некоторого времени ее беспокоили жажда и полиурия. Жажду, она пыталась утолить сладкими газированными напитками. Диагноз диабета ей ранее не ставили.

1. Назовите нормы данных лабораторных показателей.

2. Какой диагноз можно предположить? Обоснуйте свое мнение.

3. Объясните причину изменения лабораторных показателей при данном диагнозе.

4. Какой вид диабетической комы в данном случае?

5. Какое лечение можно предложить в данном случае?

**Задача №3**

У трех больных с подозрением на сахарный диабет был проведен ГТТ.

Результаты ГТТ указаны в таблице.

**Таблица №1.**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| № | Натощак, ммоль\л | 60 мин, ммоль\л | 90 мин. ммоль/л | 120 мин, ммоль\л |
| 1 | 5.7 | 10.3 | 9.3 | 8.3 |
| 2 | 4.4 | 7.1 | 3.8 | 4.5 |
| 3 | 7.7 | 12.4 | 11.9 | 11.1 |

**Таблица №2.**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| № | Натощак, ммоль/л | 60 мин, ммоль/л | 90 мин, ммоль/л | 120 мин, ммоль/л |
| 1 | 7.6 | 12.6 | 11.3 | 8.9 |
| 2 | 5.5 | 7.8 | 4.2 | 5.4 |
| 3 | 6.3 | 11.1 | 9.3 | 8.6 |

**Таблица №3.**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| № | Натощак, ммоль/л | 60 мин, ммоль/л | 90 мин, ммоль/л | 120 мин, ммоль/л |
| 1 | 6.6 | 11.6 | 8.5 | 8.3 |
| 2 | 5.5 | 7.8 | 4.2 | 5.4 |
| 3 | 3.0 | 2.5 | 2.3 | 2.4 |

**Таблица № 4**.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| № | Натощак, ммоль/л | 60 мин, ммоль/л | 90 мин, ммоль/л | 120 мин, ммоль/л |
| 1 | 7.6 | 11.6 | 12.0 | 8.6 |
| 2 | 5.0 | 7.4 | 4.0 | 4.6 |
| 3 | 2.9 | 2.3 | 2.4 | 2.5 |

1. Постройте графики ГТТ для каждого пациента, определите тип гликемической кривой.

2. Оцените результаты ГТТ и сделайте выводы.

3. Какие дополнительные исследования нужно провести больным с диагнозом «сахарный диабет»? Какие изменения в крови и моче могут при этом наблюдаться?

**4. Итоговый контроль знаний.**

Тестирование.

**5. Подведение итогов.**

**6. Домашнее задание: (1)**

**ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 14 ИТОГОВОЕ ЗАНЯТИЕ ПО ТЕМЕ «ОБМЕН УГЛЕВОДОВ».**

**Значение темы:** Углеводы являются одним из основных источников энергии для организма, а также важным компонентом многих внутриклеточных и внеклеточных структур, из углеводов могут образовываться заменимые аминокислоты и жиры. Нарушения в обмене углеводов приводят к таким заболеваниям как гликогенозы, галактоземия, фруктозурия. Знание гормональной регуляции обмена углеводов в целом и уровня глюкозы в крови, в частности, необходимо для правильной диагностики таких заболеваний как сахарный диабет, панкреатит и других.

На основе теоретических знаний и практических умений обучающийся должен

**знать**:

- строение, свойства, классификацию углеводов;

- этапы обмена углеводов; переваривание и всасывание углеводов в ЖКТ;

- промежуточный обмен углеводов;

- гормональную и аллостерическую регуляцию обмена углеводов;

- роль ЦНС и печени в обмене углеводов;

- пути нарушения обмена углеводов в организме человека;

- классификация, биохимические нарушения, лабораторную диагностику сахарного диабета;

- клинико-диагностическое значение определения концентрации глюкозы в биологических жидкостях;

**уметь:**

* получать плазму и сыворотку из венозной крови, капиллярную кровь.
* определять концентрацию глюкозы в различных биологических жидкостях, проводить ГТТ; определять НвА1с, сиаловые кислоты, лактат в крови;
* заполнять бланк анализа.

Студент должен овладеть **общими компетенциями**:

OK 1. Понимать сущность и социальную значимость своей будущей профессии, проявлять к ней устойчивый интерес.

ОК 2. Организовывать собственную деятельность, определять методы и способы выполнения профессиональных задач, оценивать их эффективность и качество.

ОК 3. Решать проблемы, оценивать риски и принимать решения в нестандартных ситуациях.

OK 8. Самостоятельно определять задачи профессионального и личностного развития, заниматься самообразованием, осознанно планировать повышение квалификации.

ОК 9. Быть готовым к смене технологий в профессиональной деятельности.

ОК 13. Организовывать рабочее место с соблюдением требований охраны труда, производственной санитарии, инфекционной и противопожарной безопасности.

Студент должен овладеть профессиональными компетенциями

ПК 3.1. Готовить рабочее место для проведения лабораторных биохимических исследований.

ПК 3.2. Проводить лабораторные биохимические исследования биологических материалов; участвовать в контроле качества.

ПК 3.3. Регистрировать результаты биохимических исследований.

ПК 3.4. Проводить утилизацию отработанного материала, дезинфекцию и стерилизацию использованной лабораторной посуды, инструментария, средств защиты.

**План изучения темы:**

**1.Контроль исходного уровня знаний.**

**Ответьте на следующие вопросы:**

1. Общая химическая формула углеводов…
2. По химическому строению глюкоза является …
3. По химическому строению фруктоза является…
4. Молекула сахарозы состоит из…
5. Молекула мальтозы состоит из…
6. Молекула лактозы состоит из…
7. Содержание глюкозы в крови в норме…
8. Повышенное содержание глюкозы в крови это…
9. Появление глюкозы в моче это…
10. Почечный порог для глюкозы составляет…
11. Окисление глюкозы с образованием АТФ это…
12. Синтез глюкозы из неуглеводных компонентов это…
13. Распад гликогена в печени называется…
14. При окислении 1 молекулы глюкозы анаэробным путем образуется…
15. Пентозофосфатный распад глюкозы характерен для клеток…
16. При окислении 1 молекулы глюкозы непрямым аэробным путем образуется…
17. Наиболее интенсивно переваривание углеводов происходит в …
18. Ферменты, расщепляющие углеводы это…
19. Анаэробный распад глюкозы характерен для клеток…
20. Общим промежуточным продуктом анаэробного и аэробного непрямого пути является…
21. Основной показатель углеводного обмена это…
22. Поражение в - клеток поджелудочной железы является причиной…
23. Гормон, понижающий уровень глюкозы в крови…
24. Появление в крови большого количества кетоновых тел в крови способствует развитию…
25. Гормон активирующий глюконеогенез…
26. При подозрении на сахарный диабет проводят …
27. При сахарном диабете ацетил – КоА…
28. При гипергликемической коме вводят…
29. Биохимическими показателями сахарного диабета являются…
30. Группа наследственных заболеваний в основе, которых лежат нарушения деятельности ферментов называется …

**2. Итоговый контроль знаний.**

Выполнение индивидуальных заданий, включающих:

- теоретические вопросы;

- выполнение индивидуального практического задания;

- решение ситуационной задачи.

**3. Подведение итогов.**

**4. Домашнее задание: (1)**

# Литература

**Перечень основной литературы**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | | | **Кол-во экземпляров** | |
| **№ п/п** | **Наименование, вид издания** | **Автор(-ы), составитель(-и), редактор(-ы)** | **Место издания, издательство, год** | **В библиотеке** | **На кафедре** |
| **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** |
| 1 | [Медицинская лабораторная диагностика: программы и алгоритмы](http://krasgmu.ru/index.php?page%5bcommon%5d=elib&cat=catalog&res_id=61016) : рук. для врачей | ред. А. И. Карпищенко | М. : ГЭОТАР-Медиа, 2014. | 35 |  |
| 2 | [Основы биохимии для медицинских колледжей](http://krasgmu.ru/index.php?page%5bcommon%5d=elib&cat=catalog&res_id=34719) : учеб. пособие | Л. М. Пустовалова | Ростов н/Д : Феникс, 2012. | 148 |  |

**Перечень дополнительной литературы**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | | | **Кол-во экземпляров** | |
| № п/п | **Наименование, вид издания** | **Автор(-ы), составитель(-и), редактор(-ы)** | **Место издания, издательство, год** | **В библиотеке** | **На кафедре** |
| **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** |
| 1 | [Клиническая лабораторная диагностика](http://krasgmu.ru/index.php?page%5bcommon%5d=elib&cat=catalog&res_id=52966) [Электронный ресурс] : учеб. пособие для мед. сестер. - Режим доступа: http://www.medcollegelib.ru/book/ISBN9785970427620.html | А. А. Кишкун | М. : ГЭОТАР-Медиа, 2014. | ЭБС Консультант студента (Фармколледж) |  |
| 2 | [Теория и практика лабораторных биохимических исследований](http://krasgmu.ru/index.php?page%5bcommon%5d=elib&cat=catalog&res_id=55170) [Электронный ресурс] : сб. метод. указаний для обучающихся к практ. занятиям по специальности 31.02.03 - Лабораторная диагностика. Ч. 1.. - Режим доступа: http://krasgmu.vmede.ru/index.php?page[common]=elib&cat=&res\_id=55170 | сост. Г. В. Перфильева | Красноярск : КрасГМУ, 2015. | ЭБС КрасГМУ |  |
| 3 | [Теория и практика лабораторных биохимических исследований](http://krasgmu.ru/index.php?page%5bcommon%5d=elib&cat=catalog&res_id=42424) [Электронный ресурс] : сб. тестовых заданий с эталонами ответов для внеаудитор. самостоят. работы студентов, обучающихся по специальности 060604 - Лабораторная диагностика. - Режим доступа: http://krasgmu.vmede.ru/index.php?page[common]=elib&cat=&res\_id=42424 | сост. Г. В. Перфильева | Красноярск : КрасГМУ, 2014. | ЭБС КрасГМУ |  |
| 4 | [Теория и практика лабораторных биохимических исследований](http://krasgmu.ru/index.php?page%5bcommon%5d=elib&cat=catalog&res_id=42426) [Электронный ресурс] : сб. ситуац. задач с эталонами ответов для внеаудитор. самостоят. работы студентов, обучающихся по специальности 060604 - Лабораторная диагностика. - Режим доступа: http://krasgmu.vmede.ru/index.php?page[common]=elib&cat=&res\_id=42426 | сост. Г. В. Перфильева | Красноярск : КрасГМУ, 2014. | ЭБС КрасГМУ |  |
| 5 | [Теория и практика лабораторных биохимических исследований](http://krasgmu.ru/index.php?page%5bcommon%5d=elib&cat=catalog&res_id=65484) [Электронный ресурс] : сб. метод. указаний для обучающихся к практ. занятиям по специальности 31.02.03 - Лабораторная диагностика (базовой, углубленной подготовки). Ч. 4.. - Режим доступа: http://krasgmu.vmede.ru/index.php?page[common]=elib&cat=&res\_id=65484 | сост. Г. В. Перфильева | Красноярск : КрасГМУ, 2016. | ЭБС КрасГМУ |  |

**Электронные ресурсы:**

ЭБС КрасГМУ «Colibris»;

ЭБС Консультант студента ВУЗ

ЭБС Консультант студента Колледж

ЭМБ Консультант врача

ЭБС Айбукс

ЭБС Букап

ЭБС Лань

ЭБС Юрайт

СПС КонсультантПлюс

НЭБ eLibrary