

**УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ – ШТИП**

**ФАКУЛТЕТ ЗА МЕДИЦИНСКИ НАУКИ**

*Доц. д-р ТАТЈАНА РУШКОВСКА*

# **ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА**

---

**РЕЦЕНЗИРАН ПРАКТИКУМ**

*Штип, декември 2012 година*

**Автор**

Доц. д-р Татјана Рушковска

**ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА**

- рецензиран практикум -

**Рецензенти:**

Проф. д-р Никола Камчев

Проф. д-р Рубин Гулабоски

Проф. д-р Биљана Ѓорѓеска

**Лектори:**

д-р Толе Белчев

д-р Ранко Младеноски

**Техничко уредување:**

Татјана Рушковска

**Издавач:**

Универзитет «Гоце Делчев» - Штип

**Електронско издание**

CIP - Каталогизација во публикација

Национална и универзитетска библиотека “Св. Климент Охридски”, Скопје

577(075.8)

612.015(075.8)

РУШКОВСКА, Татјана

Основи на биохемија [Електронски извор] : рецензиран практикум /  
Татјана Рушковска. - Текст, слики. - Штип : Универзитет “Гоце  
Делчев”, Факултет за медицински науки, 2012. - 49 стр. : илустр. ; 27 см

Начин на пристап (URL): <http://www.ugd.edu.mk>. - Наслов преземен од  
екранот. - Опис на изворот на ден 14.11.2012

ISBN 978-608-4504-93-1

а) Биохемија - Високошколски учебници

COBISS.MK-ID 92684554

# ПРЕДГОВОР КОН ПРАКТИКУМОТ „ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА“

---

Практикумот „Основи на биохемија“ е комплементарно учебно помагало на истоимената скрипта. Истиот е наменет за изведување на практичната настава по предметот Основи на биохемија на Факултетот за медицински науки.

Во практикумот се обработени вкупно 12 вежби, согласно наставната програма.

Сите практични вежби опфатени во овој практикум се одбрани со особено внимание со цел да бидат едноставни за изработка и секој студент да биде во можност самостојно да ги изработи.

Дел од практичните вежби претставуваат класични методи од базичната биохемија, но дел се современи клиничко-биохемиски анализи кои рутински се изработуваат во клиничката пракса. На тој начин, на практичната настава по предметот Основи на биохемија ѝ се дава еден современ израз, а студентите се запознаваат со биохемиски методи кои имаат реална практична примена.

Како комплементарен дел на далеку пообемната скрипта, во практикумот се дадени само постапките за изведување на вежбите. Поради тоа, со цел да ја разберат суштината на практичните вежби, неопходно е, пред да пристапат кон изведување на вежбата, студентите претходно да ги имаат совладано теоретските основи за секоја вежба, односно соодветниот материјал од скриптата и начинот за изведување на вежбата што е даден во практикумот.

*Од авторот*

# СОДРЖИНА

---

## 1. ОСНОВНИ МЕРКИ ЗА ЗАШТИТА ПРИ РАБОТА ВО БИОХЕМИСКА ЛАБОРАТОРИЈА

1.1. ОСНОВНИ МЕРКИ ЗА ЗАШТИТА ПРИ РАБОТА ВО ХЕМИСКА ЛАБОРАТОРИЈА И ВО БИОХЕМИСКА ЛАБОРАТОРИЈА СО ОПШТА НАМЕНА

1.2. ЗАШТИТА ПРИ РАБОТА СО КРВ И ТЕЛЕСНИ ТЕЧНОСТИ

## 2. ЗАТВОРЕН СИСТЕМ ЗА ЗЕМАЊЕ НА КРВ И ЗЕМАЊЕ НА ВЕНСКА И КАПИЛАРНА КРВ

## 3. ПИПЕТИРАЊЕ И МЕРЕЊЕ СО ФОТОМЕТРИСКИ ТЕХНИКИ

3.1. ПИПЕТОРИ И ТЕХНИКА НА ПИПЕТИРАЊЕ

3.1.1. Пипетори

3.1.2. Техника на пипетирање

3.2. ОСНОВНИ ПРИНЦИПИ НА ФОТОМЕТРИЈАТА

## 4. ТАЛОЖЕЊЕ И ДЕНАТУРАЦИЈА НА ПРОТЕИНИ

4.1. ТАЛОЖЕЊЕ НА ПРОТЕИНИ СО КОНЦЕНТРИРАН ЕТАНОЛ

4.2. ДЕНАТУРАЦИЈА НА ПРОТЕИНИ СО ВАРЕЊЕ

4.3. ТАЛОЖЕЊЕ НА ПРОТЕИНИ СО КОНЦЕНТРИРАНИ МИНЕРАЛНИ КИСЕЛИНИ

4.4. ТАЛОЖЕЊЕ НА ПРОТЕИНИ СО СОЛИ НА ТЕШКИ МЕТАЛИ

## 5. КВАЛИТАТИВНО ДОКАЖУВАЊЕ И КВАНТИТАТИВНО ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ВКУПНИ ПРОТЕИНИ СО БИУРЕТСКА РЕАКЦИЈА

5.1. КВАЛИТАТИВНО ДОКАЖУВАЊЕ НА ВКУПНИ ПРОТЕИНИ СО БИУРЕТСКА РЕАКЦИЈА

5.2. КВАНТИТАТИВНО ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ВКУПНИ ПРОТЕИНИ СО БИУРЕТСКА РЕАКЦИЈА

## 6. ВЛИЈАНИЕ НА АКТИВАТОРИ И ИНХИБИТОРИ ВРЗ ЕНЗИМСКАТА АКТИВНОСТ НА ПЛУНКОВНАТА АМИЛАЗА

## 7. РАСТВОРЛИВОСТ НА ЛИПИДИТЕ. КВАЛИТАТИВНО ДОКАЖУВАЊЕ НА ХОЛЕСТЕРОЛ СПОРЕД SALKOWSKI

7.1. РАСТВОРЛИВОСТ НА ЛИПИДИТЕ

7.1.1. Растворливост во органски растворувачи

7.1.2. Растворливост во вода

7.2. КВАЛИТАТИВНО ДОКАЖУВАЊЕ НА ХОЛЕСТЕРОЛ СПОРЕД SALKOWSKI

**8. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЈАТА НА ВКУПЕН ХОЛЕСТЕРОЛ ВО СЕРУМ (ЕНЗИМСКА КВАНТИТАТИВНА МЕТОДА)**

**9. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЈАТА НА ТРИАЦИЛГЛИЦЕРОЛИ ВО СЕРУМ (ЕНЗИМСКА КВАНТИТАТИВНА МЕТОДА)**

**10. ФЕЛИНГОВА ПРОБА. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЈАТА НА ГЛИКОЗА ВО СЕРУМ СО GOD-PAP МЕТОДА (ЕНЗИМСКА КВАНТИТАТИВНА МЕТОДА)**

**10.1. ФЕЛИНГОВА ПРОБА**

**10.2. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЈАТА НА ГЛИКОЗА ВО СЕРУМ СО GOD-PAP МЕТОДА (ЕНЗИМСКА КВАНТИТАТИВНА МЕТОДА)**

**11. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЈАТА НА ГЛИКОЗА ВО СЕРУМ СО МЕТОДА СО ХЕКСОКИНАЗА (ЕНЗИМСКА КВАНТИТАТИВНА МЕТОДА)**

**12. ПРИРАЧЕН ГЛИКОМЕТАР. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ГЛИКОЗА И КЕТОНСКИ ТЕЛА ВО УРИНА СО ТЕСТ-ЛЕНТИ**

**12.1. ПРИРАЧЕН ГЛИКОМЕТАР**

**12.2. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ГЛИКОЗА И КЕТОНСКИ ТЕЛА ВО УРИНА СО ТЕСТ-ЛЕНТИ**

## ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ

### ОСНОВНИ МЕРКИ ЗА ЗАШТИТА ПРИ РАБОТА ВО БИОХЕМИСКА ЛАБОРАТОРИЈА

Доц. д-р Татјана Рушковска

# 1. ОСНОВНИ МЕРКИ ЗА ЗАШТИТА ПРИ РАБОТА ВО БИОХЕМИСКА ЛАБОРАТОРИЈА

## 1.1. ОСНОВНИ МЕРКИ ЗА ЗАШТИТА ПРИ РАБОТА ВО ХЕМИСКА ЛАБОРАТОРИЈА И ВО БИОХЕМИСКА ЛАБОРАТОРИЈА СО ОПШТА НАМЕНА

Постојат низа опасности што се присутни при работа во хемиските лаборатории и во биохемиските лаборатории каде се испитуваат неинфективни примероци.

Тие опасности генерално можат да се класифицираат на следниот начин:

- Опасност од хемиски агенси,
- Опасност од струен удар и
- Опасност од пожар.

Со цел да се создадат услови за безбедна работа мора да се почитуваат основните правила за работа во лабораторија.

### Основни правила за работа во лабораторија:

- Користење на соодветна работна облека.
- Одржување на ред и хигиена во лабораторијата.
- Функционално подредување на работното место.
- Соодветна манипулација со реагенсите:
  - Испарливите и запаливи реагенси да не се држат близу пламен,
  - Епруветите и реагенсите да не се држат близу до очите,
  - При загревање на епрувета да се користи мал пламен,
  - Рамномерно да се загрева епруветата,
  - Да не се мешаат реагенси што даваат експлозивни смеси ( $\text{HNO}_3$  и глицерол,  $\text{HNO}_3$  и фенол),
  - При разредување на сулфурна киселина **не смее да се додава вода во киселината!!!**
- Познавање на основните правила за прва помош при повреди:
  - При изгореници со киселини - промивање со  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,
  - При изгореници со бази - промивање со разредена оцетна киселина.

## ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ

### ОСНОВНИ МЕРКИ ЗА ЗАШТИТА ПРИ РАБОТА ВО БИОХЕМИСКА ЛАБОРАТОРИЈА

Доц. д-р Татјана Рушковска

---

## 1.2. ЗАШТИТА ПРИ РАБОТА СО КРВ И ТЕЛЕСНИ ТЕЧНОСТИ

При дефинирањето на улогата и значењето на клиничката биохемија беше нагласено дека таа претставува наука што се занимава со проучување на хемискиот состав на телесните течности и ткива. Во практиката, како материјал за анализа најчесто се користи крвта, а веднаш потоа следи урината.

Токму од таа причина, во клиничко-биохемиските лаборатории, покрај спроведувањето на општите мерки за заштита при работа во лабораторија, треба да се посвети големо внимание и на примената на специфичните мерки за заштита при работа со крв и телесни течности. Тие мерки всушност се однесуваат на заштита од инфекција со патогени микроорганизми што се присутни во биолошкиот материјал од хумано потекло.

Инфекцијата може да се пренесе:

- Од пациент на здравствено лице,
- Од здравствено лице на пациент и
- Од пациент на пациент.

При сите овие можни начини на трансмисија ризикот зависи од:

- Преваленцијата на инфицирани лица во популацијата,
- Фреквенцијата на експозицијата,
- Природата на експозицијата,
- Релативната инфективност на патогениот микроорганизам и
- Концентрацијата на патогениот микроорганизам.

Стратегијата за превенција на трансмисијата на патогени микроорганизми кои се присутни во биолошкиот материјал од хумано потекло во здравствените институции е следната: **секој пациент (примерок за анализа) да се смета за потенцијално инфициран (инфективен).**

Доколку се практикуваат сите препорачани **мерки на претпазливост**, трансмисијата на патогени микроорганизми кои се присутни во биолошкиот материјал од хумано потекло ќе биде избегната. Се препорачуваат следните мерки на претпазливост:

1. После употребата иглите никогаш не смеат да се виткаат или да се кршат. Веднаш по употребата иглите треба да се фрлат во цврст пластичен контејнер (**не во пластична кеса**) за еднократна употреба, што е сместен веднаш до местото каде се користат иглите. Кога контејнерот ќе се наполни најмногу до 2/3 од неговиот волумен истиот треба да се затвори и да се фрли, на начин на кој се постапува со секој друг медицински отпад.

2. Да се избегнува непотребно подавање на игли и останати контаминирани остри предмети. Да не се практикува затворање со капаче на веќе употребена игла, туку таа веднаш да се фрли во пластичен контејнер за таа намена. Ако веќе мора да се затвори употребената игла, тогаш капачето треба да се остави на

## ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ

### ОСНОВНИ МЕРКИ ЗА ЗАШТИТА ПРИ РАБОТА ВО БИОХЕМИСКА ЛАБОРАТОРИЈА

Доц. д-р Татјана Рушковска

работната површина, а иглата треба да се вметне во него. Дури потоа со рака може да се притисне капачето врз иглата.

3. Повредената кожа и отворените рани да се прекријат со водоотпорен фластер.

4. Да се носат заштитни ракавици за еднократна употреба секогаш кога се очекува експозиција на крв (задолжително при вадење на крв) и други телесни течности и секогаш кога се работи со биолошки материјал од хумано потекло.

5. Пред напуштање на работната просторија заштитните ракавици да се отстранат и да се одложат во канта наменета за медицински отпад.

6. По отстранувањето на заштитните ракавици задолжително е рацете добро да се измијат со вода и сапун. Честото миење на рацете ја прави кожата сува и поради тоа послабо заштитена од зараза, па затоа треба да се користи заштитен крем за раце.

7. Во сите лаборатории во кои се работи со крв и останати телесни течности пипетирањето со уста да се замени со механичко пипетирање.

8. Да се користат заштитни кабинети секогаш кога во тек на работниот процес се создаваат аеросоли. Центрифугите треба редовно да се чистат и дезинфицираат.

9. Транспортот на примероци од крв или други телесни течности да се врши во добро затворени контејнери, со цел да се спречи нивното истекување.

10. Во работните простории не е дозволено јадење, пиење и пушење, како и држење на прибор за јадење. Во фрижидерите во кои се чуваат реагенси не е дозволено чување на храна и пијалаци.

11. Во случај на контаминација на кожата со биолошки материјал истиот веднаш треба да се отстрани, а контаминираното место да се дезинфицира.

12. По директна контаминација со крв или други телесни течности површините (подови, работни маси и сл.) што се контаминирани се преливаат со концентриран хлорен препарат, а потоа, по 10-20 минути, се бришат и дезинфицираат.

13. Санитарните простории треба редовно да се чистат и дезинфицираат.

14. Медицинскиот отпад треба да се одложува во склад со законските регулативи и правилникот на здравствената организација.



## ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ

### ОСНОВНИ МЕРКИ ЗА ЗАШТИТА ПРИ РАБОТА ВО БИОХЕМИСКА ЛАБОРАТОРИЈА

Доц. д-р Татјана Рушковска

---

Медицинскиот отпад се дефинира како единствена форма на течен и цврст отпад кој настанува при дијагностицирање, третман и превенција на болестите кај човекот. Тука спаѓаат: крв и крвни продукти, други телесни течности, игли, системи за инфузија, скалпели, ракавици, газа, човекови ткива и органи. Освен тоа во медицински отпад спаѓаат и остатоците од калибратори, контроли и реагенси од хумано потекло, односно сите оние компоненти на китовите кои имаат ознака **biohazard** (инфективен материјал, опасност од зараза).



Симбол за инфективен материјал

## ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ

ЗАТВОРЕН СИСТЕМ ЗА ЗЕМАЊЕ НА КРВ И ЗЕМАЊЕ НА ВЕНСКА И КАПИЛАРНА КРВ

Доц. д-р Татјана Рушковска

# 2. ЗАТВОРЕН СИСТЕМ ЗА ЗЕМАЊЕ НА КРВ И ЗЕМАЊЕ НА ВЕНСКА И КАПИЛАРНА КРВ

---

**Валидноста на добиените резултати од лабораториските испитувања зависи не само од технички добро изработената анализа, туку и од правилниот начин на земање на материјалот за анализа.**

Во клиничко-биохемиските лаборатории како и во медицинските установи воопшто, стандардно се користи *затворен систем за земање на крв*. Овој систем обезбедува врвна заштита на медицинскиот персонал бидејќи, освен во ретки случаи, со негова употреба се оневозможува излегување и на најмало количество крв надвор од системот. Од исто толкаво значење е и максималната заштита на пациентите што ја овозможува ваквиот систем.

Затворените системи за земање на крв што денеска се во широка употреба насекаде во светот можат да се поделат во две категории:

1. *Затворен систем за земање на крв со двојна можност: вакуум и рачна аспирација и*
2. *Затворен систем за земање на крв со вакуум.*

Супериорноста на затворениот систем со двојна можност се состои во посебниот дизајн што овозможува користење на рачна аспирација кај пациентите со тенки, фрагилни и/или колабирани вени, со што се избегнуваат повторните венопункции, како и хемолизата на примероците.

Епруветите од двата типа затворен систем за земање на крв што најчесто се користат во рутинските клиничко-биохемиски лаборатории во нашата земја, заедно со бојата на нивните капачиња која е практично да се знае заради нивна идентификација во тек на работата, се дадени во следната табела:

## ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ

### ЗАТВОРЕН СИСТЕМ ЗА ЗЕМАЊЕ НА КРВ И ЗЕМАЊЕ НА ВЕНСКА И КАПИЛАРНА КРВ

Доц. д-р Татјана Рушковска

	Затворен систем со двојна можност: вакуум и рачна аспирација	Затворен систем со вакуум
Серумска епрувета, со активатор на коагулација	БЕЛА	ЦРВЕНА
Епрувета со антикоагуланс EDTA (за хемограм)	ЦРВЕНА	ВИОЛЕТОВА
Епрувета со антикоагуланс цитрат (1дел цитрат + 4 дела крв), за брзина на седиментација на еритроцитите	ВИОЛЕТОВА	ЦРНА
Епрувета со антикоагуланс цитрат (1дел цитрат + 9 дела крв), за коагулационен статус	ЗЕЛЕНА	СИНА

### Карактеристични белези на затворените системи за земање на крв

Освен тоа постојат и епрувети за специјална намена, како што се епрувети за изработка на гасни анализи, епрувети за анализа на елементи во траги и др.

На следната слика е прикажан еден комплетен затворен систем за земање на крв со вакуум:



Компоненти на затворен систем за земање на крв со вакуум

## ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ

### ЗАТВОРЕН СИСТЕМ ЗА ЗЕМАЊЕ НА КРВ И ЗЕМАЊЕ НА ВЕНСКА И КАПИЛАРНА КРВ

Доц. д-р Татјана Рушковска

Процесот на земање на крв за анализа се означува како **флеботомија**, а стручното лице што е обучено за земање на крв се нарекува **флеботомист**. Како што беше кажано претходно, во клиничко-биохемиските лаборатории може да се анализира венска, капиларна и артериска крв. Најчесто се користи венска крв, поретко капиларна, а артериската вообичаено се користи само за гасни анализи.

За да се добие примерок од венска крв се врши **венопункција**, најчесто на *медијалната кубитална вена во антекубиталната вдлабнатина*. Покрај тоа, за венопункција може да се искористат и вените од дорзалната страна на дланката, што сепак не се толку погодни и треба да се избегнуваат кај лица со лоша периферна циркулација.

Пациентот на кој треба да му се изврши венопункција треба да биде во седната положба колку што е можно подолго пред интервенцијата од причина што промената на положбата на телото влијае врз вредноста на некои аналити. *Венопункција никогаш не се изведува на пациент во стоечка положба.*

Многу честа грешка во преаналитичката фаза што се прави во болнички услови е земање на крв над местото на кое е вклучена инфузија, при што доаѓа до контаминација на примерокот за анализа. Поради тоа треба, колку што е можно, да се избегнува земање на крв додека пациентот прима инфузија. Доколку сепак мора да се земе крв од пациент што прима инфузија, најдобро е тоа да се направи од другата рака и секако во листата да се забележи дека крв е земена додека пациентот бил под инфузија.

Местото каде ќе се изврши венопункцијата треба да се дезинфицира со дезинфициенс чија употреба е одобрена од здравствената организација. Иако постојат различни дезинфициенси, кај нас вообичаено се користи 70% етанол.

Дезинфицирањето на местото на венопункција се врши со **кружни движења**. По дезинфекцијата местото треба да се исуши на воздух. Доколку на местото на венопункција остане дезинфициенс, тој може да предизвика хемолиза на примерокот. По дезинфекцијата, местото за венопункција повеќе не смее да се допира.

Над местото на венопункција се врзува подврска. Кога крвта ќе почне да тече во епруветата, подврската се одврзува, без притоа да се помрдне иглата. Многу ретко е неопходно подврската да остане врзана подолго од една минута. Треба да се нагласи дека доколку подврската остане врзана подолго од три минути, тоа предизвикува значајни промени на составот на крвта.

Пумпање со дланката пред венопункцијата треба да се избегнува затоа што предизвикува покачување на концентрацијата на калиум, неоргански фосфат и лактат.

**Епруветите, особено оние со антикоагуланс, треба да се наполнат до ознаката, со цел да се постигне потребниот сооднос крв / антикоагуланс.**

Многу ретко, кај некои пациенти може да се случи враќање на крвта од епруветата во вената (backflow), што е резултат на намалениот притисок во вената. Враќањето на крвта се превенира на тој начин што во тек на процедурата

## ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ

### ЗАТВОРЕН СИСТЕМ ЗА ЗЕМАЊЕ НА КРВ И ЗЕМАЊЕ НА ВЕНСКА И КАПИЛАРНА КРВ

Доц. д-р Татјана Рушковска

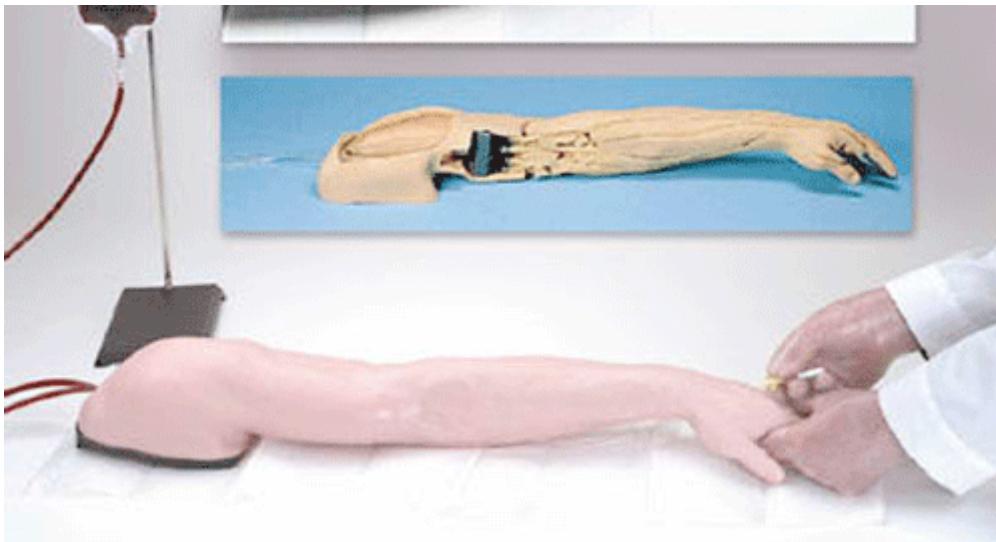
---

на земање на крв раката се држи надолу и не се дозволува контакт на крвта со капачето на епруветата.

Кога земањето на крв е завршено, парче сува вата благо се притиска на местото на венопункцијата, а иглата полека се вади од вената. Притоа на пациентот му се дава инструкција ватата да ја држи со благ притисок 2-3 минути, најдобро со подигната рака.

Флеботомистот сега ги отстранува заштитните ракавици и ги фрла. Доколку заштитните ракавици се видливо контаминирани истите се фрлаат во канта за инфективен отпад. Доколку нема видлива контаминација, ракавиците се фрлаат во канта за неинфективен отпад. Потоа флеботомистот треба да ги измие рацете со вода и сапун или пак да ги дезинфицира со дезинфекционо средство на база на алкохол, што зависи од правилникот на здравствената организација во која работи. Дури потоа се ставаат нови заштитни ракавици и се пристапува кон следниот пациент.

Техниката на венопункција се совладува преку практична обука која секогаш треба да започне со користење на специјални модели – фантоми.



**Фантом за совладување на техниката на венопункција**

## ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ

### ЗАТВОРЕН СИСТЕМ ЗА ЗЕМАЊЕ НА КРВ И ЗЕМАЊЕ НА ВЕНСКА И КАПИЛАРНА КРВ

Доц. д-р Татјана Рушковска

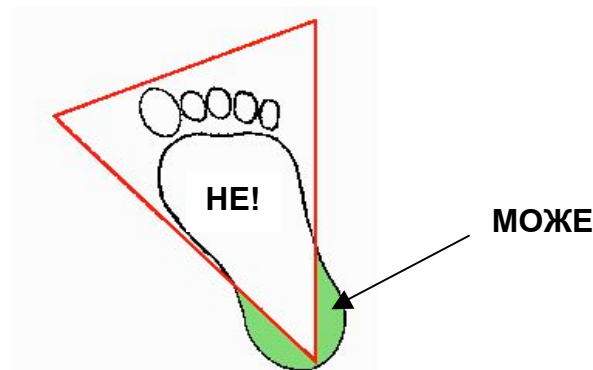
**Земањето на капиларна крв** претставува **отворена техника** на земање на крв при што се прави убод на кожата со ланцета и се собира мало количество на крв во соодветна капилара или микропрувета.

Оваа техника во практиката најчесто се користи во следните случаи:

- Кај мали деца, поради ограниченото количество на примерок,
- Кога честите венепункции довеле до оштетување на вените,
- При тешки изгореници и повреди, кога вените не се достапни за венепункција и
- Во единиците за интензивна нега, кога примерокот директно се аплицира во анализаторот.

**Капиларна крв се зема од:**

- **Јагодицата на прстот,**
- **Ушната ресичка или**
- **Петата, кај доенчиња.**



#### **Места кои се соодветни за земање на капиларна крв од пета**

Местото на убодот најпрвин треба да се дезинфицира. Откако дезинфициенсот ќе се исуши, се прави убод со ланцета, длабок околу 2,5 mm. Првата капка крв се брише, а следната капка (или следните капки - зависно од количеството потребна крв) се собираат на начин соодветен за анализата која треба да се изработи.

При слаба периферна циркулација местото на убодот не треба да се масира, туку треба благо да се загрее.

## ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ

### ПИПЕТИРАЊЕ И МЕРЕЊЕ СО ФОТОМЕТРИСКИ ТЕХНИКИ

Доц. д-р Татјана Рушковска

# 3. ПИПЕТИРАЊЕ И МЕРЕЊЕ СО ФОТОМЕТРИСКИ ТЕХНИКИ

## 3.1. ПИПЕТОРИ И ТЕХНИКА НА ПИПЕТИРАЊЕ

### 3.1.1. Пипетори

Пипеторите се лабораториски инструменти што се употребуваат за одмерување и пренесување на точно определен волумен на течност. Во зависност од волуменот што го пипетираме постојат два вида пипетори: микропипетори (до 1000  $\mu\text{L}$ ) и макропипетори (за пипетирање на поголем волумен).



**Макропипетор**



**Микропипетори**

Во клиничко-биохемиските лаборатории најчесто се употребуваат микропипеторите. Генерално, микропипеторите работат на принцип на истиснување на воздух. За работа со микропипеторот се користат специјално изработени пластични продолжетоци што се за еднократна употреба.

Точниот волумен што сакаме да го испипетираме е прикажан во прозорчето (или на дисплејот) што се наоѓа на рачката на пипеторот.

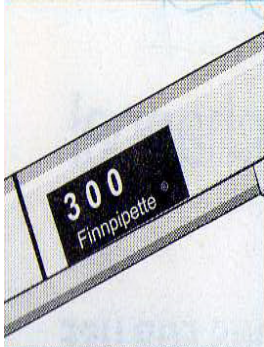
Волуменот за пипетирање се приспособува користејќи го копчето за истиснување. За да го зголемиме волуменот што сакаме да го измериме треба да го завртиме копчето во правец спротивен на стрелките на часовникот, додека за да се намали волуменот го вртиме копчето во правец на стрелките на часовникот.

## ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ

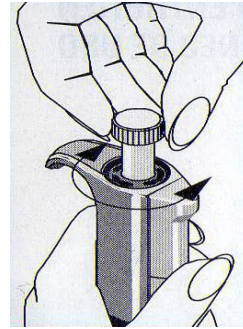
### ПИПЕТИРАЊЕ И МЕРЕЊЕ СО ФОТОМЕТРИСКИ ТЕХНИКИ

Доц. д-р Татјана Рушковска

---



**Дисплеј на микропипетор**



**Приспособување на волумен**

Пред да се продолжи со работа треба да бидеме сигурни дека бројчињата што го обележуваат волуменот се влезени во своето лежиште, односно се јасни и целосно видливи на дисплејот. Притоа не смееме да приспособуваме волумени кои се надвор од областа што ја покрива дадениот пипетор.



## ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ

### ПИПЕТИРАЊЕ И МЕРЕЊЕ СО ФОТОМЕТРИСКИ ТЕХНИКИ

Доц. д-р Татјана Рушковска

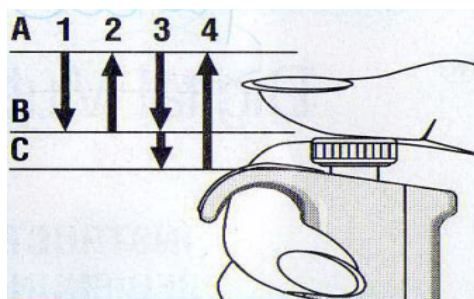
#### 3.1.2. Техника на пипетирање

Копчето за пипетирање секогаш се притиска и отпушта бавно, а особено кога работиме со течности со голема вискозност. Никогаш не смееме да дозволиме копчето што веќе сме го притиснале да го отпуштиме пребрзо или да ни отскокне нагоре. Ако тоа се случи може да дојде до навлегување на течност во телото на пипеторот и до негова контаминација. За да се спречи контаминацијата на пипеторот кај некои пипетори постојат специјални заштитни филтри што редовно треба да се менуваат.

Пред да започнеме со пипетирање најпрвин мора да бидеме сигурни дека продолжетокот е цврсто поставен на врвот на пипеторот. Пипеторот мора да се држи вертикално во моментот кога повлекуваме од течноста. Продолжетеците, растворот односно примерокот што треба да го пипетираме и пипеторот треба да се на иста температура.

**Основната техника** на пипетирање се одвива по следниот редослед:

1. Го притискаме копчето за пипетирање до првиот степен (B) и го задржуваме тука.
2. Го потопуваме врвот на продолжетокот под површината на течноста (не премногу длабоко, но доволно длабоко за да не се повлече воздух) и бавно го отпуштаме копчето. Го извлекуваме продолжетокот од течноста притоа допирајќи го со врвот сидот на садот од кој пипетираме за да се отстрани вишокот на течност.
3. Ја пренесуваме течноста од продолжетокот на саканото место и го притискаме копчето до првиот степен (B), а по околу една секунда и до вториот степен (C). Со ова ќе го испразниме продолжетокот. Го подигаме пипеторот над нивото на течноста и го ослободуваме копчето до почетната позиција (A).



Основна техника на пипетирање

**ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ**

## ПИПЕТИРАЊЕ И МЕРЕЊЕ СО ФОТОМЕТРИСКИ ТЕХНИКИ

Доц. д-р Татјана Рушковска

**3.2. ОСНОВНИ ПРИНЦИПИ НА ФОТОМЕТРИЈАТА**

Голем дел од клиничко-биохемиските методи се фотометриски, односно се засновани на мерење на интензитетот на светлината што проаѓа низ обоен раствор, па токму од таа причина е неопходно да се запознаеме со основните принципи на фотометријата.

Познато е дека човековото око може да ја гледа светлината со бранови должини помеѓу 400 и 750 nm, што се означува како видлив дел од спектарот. Светлината со бранови должини под 400 nm се означува како ултравиолетова светлина, а онаа со бранови должини над 750 nm се означува како инфрацрвена светлина. Иако невидливи за човековото око, оптичките инструменти можат да ги регистрираат и ултравиолетовата и инфрацрвената светлина.

Сончевата светлина, исто како и светлината емитувана од конвенционалните сијалици претставува смеса, односно спектар од различни бранови должини, па човековото око ја препознава како бела светлина.

Ако еден раствор што кога го гледаме наспроти бела светлина е обоен зелено (на пример раствор на никел сулфат), тоа значи дека тој всушност ја пропушта само светлината со бранова должина од 500-580 nm (зелената светлина), додека сите други останати бранови должини ги апсорбира. Слично е и со цврстите тела: зелениот предмет ја рефлектира светлината во горенаведениот опсег на бранови должини (500-580 nm), а сите други бранови должини ги апсорбира.

Во следната табела се прикажани брановите должини за различните делови од спектарот, заедно со боите кои им соодветствуваат:

<b>Бранова должина (nm)</b>	<b>Дел од спектарот</b>	<b>Боја</b>
<b>180-220</b>	<b>ултра кратки UV</b>	<b>невидлива</b>
<b>220-320</b>	<b>кратки UV</b>	<b>невидлива</b>
<b>320-400</b>	<b>долги UV</b>	<b>невидлива</b>
<b>400-440</b>	<b>видливи</b>	<b>виолетова</b>
<b>440-500</b>	<b>видливи</b>	<b>сина</b>
<b>500-580</b>	<b>видливи</b>	<b>зелена</b>
<b>580-600</b>	<b>видливи</b>	<b>жолта</b>
<b>600-620</b>	<b>видливи</b>	<b>портокалова</b>
<b>620-750</b>	<b>видливи</b>	<b>црвена</b>
<b>750-2000</b>	<b>кратки IR</b>	<b>невидлива</b>

**Бранови должини на различните делови од спектарот**

## ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ

### ПИПЕТИРАЊЕ И МЕРЕЊЕ СО ФОТОМЕТРИСКИ ТЕХНИКИ

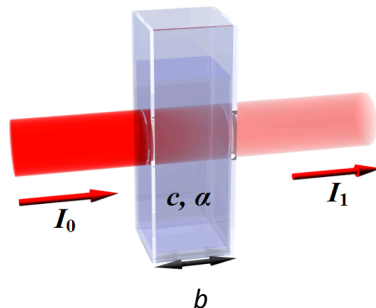
Доц. д-р Татјана Рушковска

Ако еден раствор што е обоен со пурпурна боја (на пример раствор на калиум перманганат) го гледаме наспроти бела светлина, него всушност го гледаме како пурпурен поради тоа што го пропушта синиот, виолетовиот и црвениот дел од спектарот, а ја апсорбира светлината со сите други бранови должини.

Во фотометријата, за одредување на непознати концентрации на обоените раствори, не се користи бела светлина, туку се користи светлина со точно определена бранова должина, т.н. **монохроматска светлина**. Монохроматска светлина се добива со пропуштање на бела светлина низ обоен филтер, што ги отстранува сите останати бои освен бојата што ја има самиот филтер.

Притоа, за фотометрирање се користи онаа боја на светлината што обоениот раствор најмногу ја апсорбира, односно бојата што е комплементарна со бојата на растворот. Така, за црвено и пурпурно обоените течности (на пример растворот на калиум перманганат) се користи зелено светло, односно зелен филтер, за зелено обоените раствори (на пример растворот од никел сулфат) се користи црвен филтер, за модриите раствори се користи портокалов филтер итн.

**При пропуштање на монохроматска светлина низ кивета со обоен раствор еден дел од таа светлина ќе се апсорбира, а дел ќе се пропушти.**



#### Пропуштање на монохроматска светлина низ кивета со обоен раствор

Притоа, логично е дека интензитетот на пропуштената светлина ( $I_1$ ) е помал од интензитетот на влезната светлина ( $I_0$ ), од каде се дефинира односот:

$$I_1/I_0 = T \quad \text{каде } T \text{ се означува како transmittance}$$

Вредноста на  $T$  е обратно пропорционална и логаритамски зависна од концентрацијата, поточно од интензитетот на обојувањето на растворот.

Поради ваквата зависност, од практични причини е дефиниран поимот **апсорбанција** ( $A$  е absorbance) и тоа на следниот начин:

$$A = \log I_0/I_1$$

$$A = \log 1/T$$

## ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ

## ПИПЕТИРАЊЕ И МЕРЕЊЕ СО ФОТОМЕТРИСКИ ТЕХНИКИ

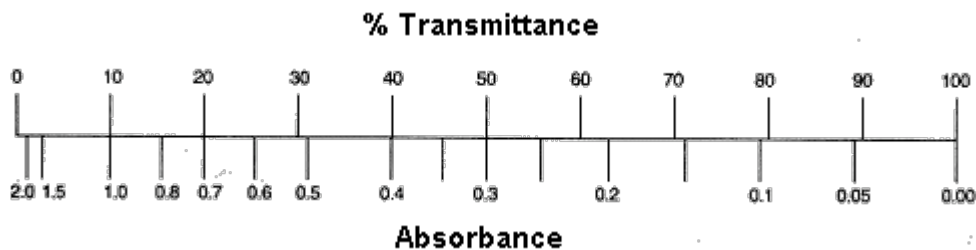
Доц. д-р Татјана Рушковска

За вредноста на **апсорбанцијата** е важно тоа што е **правопропорционално и линеарно зависна од концентрацијата, односно од интензитетот на обојувањето на растворот** (до одредена граница).

Синоними за апсорбанција се: оптичка густина (optical density O.D.) и екстинција, што е постар назив и поретко се користи.

Врската помеѓу концентрацијата, %Т и апсорбанцијата е дадена во табелата и дијаграмот кои следуваат:

Концентрација (g/L)	%Т	Апсорбанција
0	100	0,000
1	50	0,301
2	25	0,602
3	12,5	0,903



## Врска помеѓу концентрацијата, %Т и апсорбанцијата

Од претходно кажаното произлегува **Lambert-Beer**-овиот закон кој гласи:

$$A = \epsilon b c$$

**A** е апсорбанцијата, и таа е неименуван број

**$\epsilon$**  е моларен апсорпционен коефициент, што е константен за секоја супстанција ( $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ); на сликата е означен со  $\alpha$

**b** е дебелината на слојот на растворот низ кој минува монохроматската светлина, а во пракса тоа е дебелина на киветата (cm)

**c** е концентрацијата на растворената супстанција ( $\text{mol L}^{-1}$ )

## ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ

### ПИПЕТИРАЊЕ И МЕРЕЊЕ СО ФОТОМЕТРИСКИ ТЕХНИКИ

Доц. д-р Татјана Рушковска

---

Поради тоа што  $\epsilon$  и  $b$  имаат константни вредности, тие би можеле да се обединат во една константа, што би можела да се користи како фактор за конкретната метода кој директно ги поврзува вредностите на апсорбанцијата со концентрацијата.

Сепак, во праксата најдобро е, наместо фактор, да се користат еден или два стандарди со позната концентрација во рангот на линеарноста на методата, со цел да се избегне влијанието на низа фактори како што се варијациите во реагенсите, работните услови, промените на самиот фотометар и сл.

## 4. ТАЛОЖЕЊЕ И ДЕНАТУРАЦИЈА НА ПРОТЕИНИ

### 4.1. ТАЛОЖЕЊЕ НА ПРОТЕИНИ СО КОНЦЕНТРИРАН ЕТАНОЛ

#### Принцип

Концентрираниот етанол ги таложи протеините од нивните водени раствори со одземање на водената обвивка што се наоѓа околу молекулите на протеините. Таложењето може да биде реверзибилно доколку првобитниот растворувач (водата) се додаде во првите десет минути по таложењето. Во спротивно, процесот е иреверзибилен.

#### Реагенси и прибор

1. Воден раствор на белка
2. Етанол, 96%
3. Епрувети, пипети

#### Постапка

На раствор од белка се додаваат 4 mL 96% етанол. Се појавува бел талог од протеини. Ако повторно се додаде вода и тоа во првите десет минути по таложењето, талогот се раствора, што значи дека процесот е реверзибилен.

### 4.2. ДЕНАТУРАЦИЈА НА ПРОТЕИНИ СО ВАРЕЊЕ

#### Принцип

Загревањето на протеините во воден раствор доведува до губење на нивната водена обвивка, со што настанува крупнење на честичките. Меѓутоа, тие го задржуваат својот електричен полнеж, па не се таложат на дното, туку го прават растворот опалесцентен.

#### Реагенси и прибор

1. Воден раствор на белка
2. Епрувети, пипети, шпиритусна ламба

#### Постапка

2 mL раствор на белка се загрева до вриење при што се забележува бело заматување на растворот. Процесот е иреверзибилен.

## ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ

### ТАЛОЖЕЊЕ И ДЕНАТУРАЦИЈА НА ПРОТЕИНИ

Доц. д-р Татјана Рушковска

---

#### 4.3. ТАЛОЖЕЊЕ НА ПРОТЕИНИ СО КОНЦЕНТРИРАНИ МИНЕРАЛНИ КИСЕЛИНИ

##### Принцип

Концентрираните минерални киселини (HCl, HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и др.) ги таложат протеините во вид на нерастворливи комплексни соединенија.

##### Реагенси и прибор

1. Воден раствор на белка
2. Концентрирана азотна киселина
3. Епрувети, пипети

##### Постапка

Во епрувета се става 1 mL концентрирана азотна киселина и внимателно по ѕидот на епруветата и под кос агол се додава 1 mL раствор на белка. На допирната површина се формира бел талог во вид на прстен. Процесот е иреверзибилен.

#### 4.4. ТАЛОЖЕЊЕ НА ПРОТЕИНИ СО СОЛИ НА ТЕШКИ МЕТАЛИ

##### Принцип

Солиите на тешките метали: бакар (II) сулфат, жива (II) хлорид, олово (II) ацетат и др. ги таложат протеините во вид на нерастворливи метал-протеинати.

##### Реагенси и прибор

1. Воден раствор на белка
2. CuSO<sub>4</sub>, 50 g/L
3. HgCl<sub>2</sub>, 100 g/L
4. Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, 100 g/L
5. Епрувети, пипети

##### Постапка

По 2 mL раствор на белка се ставаат во 3 епрувети. Во првата се додава неколку капки раствор на CuSO<sub>4</sub>, во втората HgCl<sub>2</sub> и во третата Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>. Во сите три епрувети се формираат бели талози од денатурирани протеини. Процесот е иреверзибилен.

## ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ

### КВАЛИТАТИВНО ДОКАЖУВАЊЕ И КВАНТИТАТИВНО ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ВКУПНИ ПРОТЕИНИ СО БИУРЕТСКА РЕАКЦИЈА

Доц. д-р Татјана Рушковска

# 5. КВАЛИТАТИВНО ДОКАЖУВАЊЕ И КВАНТИТАТИВНО ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ВКУПНИ ПРОТЕИНИ СО БИУРЕТСКА РЕАКЦИЈА

## 5.1. КВАЛИТАТИВНО ДОКАЖУВАЊЕ НА ВКУПНИ ПРОТЕИНИ СО БИУРЕТСКА РЕАКЦИЈА

### Принцип

Пептидните врски во молекулата на протеините во силно алкална средина реагираат со  $\text{Cu}^{2+}$  јоните, при што се образува комплексно соединение со виолетова боја. Реакцијата е позитивна доколку супстанцијата што се анализира има најмалку две пептидни врски.

### Реагенси и прибор

1. Воден раствор на белка
2. Раствор на  $\text{NaOH}$ , 10 g/L
3. Раствор на  $\text{CuSO}_4$ , 10 g/L

### Постапка

Во епрувета се става 2 mL раствор на белка, 1-2 капки раствор на  $\text{CuSO}_4$  и 1 mL раствор на  $\text{NaOH}$ . Се добива виолетова боја што е знак за позитивна биуретска реакција.



## ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ

КВАЛИТАТИВНО ДОКАЖУВАЊЕ И КВАНТИТАТИВНО ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ВКУПНИ ПРОТЕИНИ СО БИУРЕТСКА РЕАКЦИЈА

Доц. д-р Татјана Рушковска

---

### 5.2. КВАНТИТАТИВНО ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ВКУПНИ ПРОТЕИНИ СО БИУРЕТСКА РЕАКЦИЈА

#### Принцип на методата:

Бакарните јони ( $\text{Cu}^{2+}$ ) реагираат со протеините во алкален раствор, при што соединенијата што содржат *најмалку две пептидни врски* формираат виолетов комплекс. Апсорбанцијата на овој комплекс е пропорционална со концентрацијата на протеини во примерокот.

#### Состав на реагенсот:

##### RGT:

Натриум хидроксид	200 mmol/L
Калиум натриум тартарат	32 mmol/L
Бакар сулфат	12 mmol/L
Калиум јодид	30 mmol/L

##### STD:

Протеин	8 g/dL односно 80 g/L
Натриум азид	0,095%

#### Подготовка и стабилност на реагенсите:

Реагенсот и стандардот ги добиваме во готова форма.

Тие се стабилни сè до истекот на рокот на траење, дури и после отворањето, кога се чуваат на 2...25°C.

При работа со нив **мора**ме да ја одбегнеме контаминацијата.

#### Примерок:

Серум, хепаринизирана или EDTA - плазма.

Протеините во серумот се стабилни до еден месец на температура 2...8°C или до една недела на температура од 15...25°C.

**ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ****КВАЛИТАТИВНО ДОКАЖУВАЊЕ И КВАНТИТАТИВНО ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ВКУПНИ ПРОТЕИНИ СО БИУРЕТСКА РЕАКЦИЈА**

Доц. д-р Татјана Рушковска

**Постапка:**

Бранова должина:	520-580 nm
Должина на киветата:	1 cm
Температура:	20...25°C

**Шема за пипетирање:**

	Слепа проба	Стандард	Примерок
Стандард (std)	/	20 µL	/
Примерок	/	/	20 µL
Реагенс (rgt)	1000 µL	1000 µL	1000 µL

Се промешува и се инкубира 10 минути на температура од 20...25°C. Се мери апсорбацијата на примерокот ( $\Delta A_{\text{примерок}}$ ) и на стандардот ( $\Delta A_{\text{стандард}}$ ) наспроти слепата проба за време од најмногу 30 минути.

**Пресметување на концентрацијата на вкупни протеини:**

$$C = 8 \times \frac{\Delta A_{\text{примерок}}}{\Delta A_{\text{стандард}}} \text{ [g/dl]} \quad \text{или} \quad C = 80 \times \frac{\Delta A_{\text{примерок}}}{\Delta A_{\text{стандард}}} \text{ [g/l]}$$

**Карактеристики на методата:**

Тестот за концентрација на вкупни протеини е линеарен во граници до 12 g/dL или 120 g/L. Примероците со повисока концентрација на протеини се разредуваат 1 + 1 со физиолошки раствор (0,9% NaCl) и се повторува определувањето на концентарцијата. Резултатот се множи со 2.

**Референтни вредности:**

Деца над 3 години и возрасни: 6,6 – 8,7 g/dL или 66 – 87 g/L

## ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ

КВАЛИТАТИВНО ДОКАЖУВАЊЕ И КВАНТИТАТИВНО ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ВКУПНИ ПРОТЕИНИ СО БИУРЕТСКА РЕАКЦИЈА

Доц. д-р Татјана Рушковска

---

### Забелешка:

1. Слепата проба за примерокот (*sample blank*) за бистри, безбојни примероци е еквивалентна на 0,2 g/dL и може да се занемари.  
Слепата проба за примерокот (*sample blank*) мора да се одреди доколку се работи со хемализиран, липемичен или иктеричен примерок, и тоа на следниот начин: се пипетира 20  $\mu$ L од примерокот во 1000  $\mu$ L физиолошки раствор и апсорбанцијата се мери наспроти дестилирана вода. Апсорбанцијата од слепата проба за примерокот мора да се одземе од апсорбанцијата на примерокот.
2. Реагенсот (RGT) содржи натриум хидроксид кој е иритабилен и доколку дојде во контакт со кожа или мукозни мембрани мора обилно да се исплакне со вода.
3. Стандардот (STD) содржи натриум азид како конзерванс (0,095%). Да не се голта. Да се избегнува контакт со кожа и слузави мембрани.
4. Со стоење на реагенсот (RGT) во него може да се јави слабо таложеење. При изработка на анализата талогот треба да се избегнува.

Human, протокол број SU-PROT INF 157001 GB 05-2007-16

### Нумеричка вежба:

Пресметај ја концентрацијата на вкупни протеини во серум доколку при мерењата се добиени следните резултати:

A слепа проба = 0,0025

C стандард = 80 g/L

A стандард = 0,5259

A анализа = 0,6446

Резултат: \_\_\_\_\_

## ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ

### ВЛИЈАНИЕ НА АКТИВАТОРИ И ИНХИБИТОРИ ВРЗ ЕНЗИМСКАТА АКТИВНОСТ НА ПЛУНКОВАТА АМИЛАЗА

Доц. д-р Татјана Рушковска

# 6. ВЛИЈАНИЕ НА АКТИВАТОРИ И ИНХИБИТОРИ ВРЗ ЕНЗИМСКАТА АКТИВНОСТ НА ПЛУНКОВНАТА АМИЛАЗА

## Принцип на методата:

Плунковната  $\alpha$ -амилаза има својство да врши хидролиза на скробот. Овој ензим ја зголемува својата каталитичка активност во присуство на хлоридни јони ( $\text{NaCl}$  е специфичен активатор), а иреверзибилно се инхибира под дејство на бакарните јони.

## Реагенси и прибор:

1. Скроб, 10 g/L
2. Плунка
3.  $\text{NaCl}$ , 10 g/L
4.  $\text{CuSO}_4$ , 10 g/L
5. Луголов раствор<sup>1</sup>
6. Епрувети, пипети, термостат

<sup>1</sup> Подготовка на луголов раствор: 5 г јод ( $\text{I}_2$ ) и 10 г калиум јодид ( $\text{KI}$ ) се ставаат во тиквичка од 100 mL. Се дополнува со вода до ознаката.

## ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ

### ВЛИЈАНИЕ НА АКТИВАТОРИ И ИНХИБИТОРИ ВРЗ ЕНЗИМСКАТА АКТИВНОСТ НА ПЛУНКОВАТА АМИЛАЗА

Доц. д-р Татјана Рушковска

---

#### Постапка:

Во три епрувети се става по 1 mL раствор на скроб и малку плунка. Во првата се додава 2 капки дестилирана вода, во втората 2 капки раствор на натриум хлорид и во третата 2 капки раствор на бакар (II) сулфат. Сите три епрувети се инкубираат на 37°C, 10 мин.

По инкубацијата во сите епрувети се додава луголов раствор. Познато е дека скробот со луголовиот раствор дава сино обојување – позитивна проба.

Пробата е позитивна само во епруветата во која сме додале раствор на бакар сулфат. Тоа значи дека плунковната  $\alpha$ -амилаза го разложила скробот само во првите две епрувети. Во третата епрувета, поради инхибирањето на активноста на плунковната  $\alpha$ -амилаза со бакар сулфат, таа не го разложила скробот и поради тоа го детектираме неговото присуство со помош на луголов раствор.

Методата е квалитативна.

## ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ

РАСТВОРЛИВОСТ НА ЛИПИДИТЕ. КВАЛИТАТИВНО ДОКАЖУВАЊЕ НА ХОЛЕСТЕРОЛ СПОРЕД SALKOWSKI

Доц. д-р Татјана Рушковска

---

# 7. РАСТВОРЛИВОСТ НА ЛИПИДИТЕ. КВАЛИТАТИВНО ДОКАЖУВАЊЕ НА ХОЛЕСТЕРОЛ СПОРЕД SALKOWSKI

---

## 7.1. РАСТВОРЛИВОСТ НА ЛИПИДИТЕ

### 7.1.1. Растворливост во органски растворувачи

#### Принцип

Липидите се раствораат во органски растворувачи, а степенот и брзината на растворливост зависат од видот на липидот и од растворувачот.

#### Реагенси и прибор

1. Масло
2. Растворувачи (етер, хлороформ и алкохол)
3. Епрувети, капалки

#### Постапка

Во три епрувети се става еднакво количество од растворувачите: по 1 mL етер, хлороформ и алкохол и се капнува по 3-4 капки од маслото.

Епруветите се редат според степенот на растворливоста.

## ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ

### РАСТВОРЛИВОСТ НА ЛИПИДИТЕ. КВАЛИТАТИВНО ДОКАЖУВАЊЕ НА ХОЛЕСТЕРОЛ СПОРЕД SALKOWSKI

Доц. д-р Татјана Рушковска

---

#### 7.1.2. Растворливост во вода

##### Принцип

Липидите не се раствораат во вода, туку со неа градат нестабилна емулзија. Така, со интензивно мешање на масло со вода се создава емулзија, но по кратко време повторно се одделуваат два слоја: горниот слој е масло, а долниот вода. Стабилизирањето на емулзијата со додавање жолчни киселини, протеини или сапуни е значаен феномен.

##### Реагенси и прибор

1. Масло
2. Калиум хидроксид, 50 g/L
3. Раствор на сапун
4. Раствор на белка од јајце
5. Пипета, епрувети

##### Постапка

Во четири епрувети се става по 1 mL масло. Во првата епрувета се додава 4 mL дестилирана вода, во втората епрувета 4 mL раствор на КОН, во третата 4 mL раствор од сапун и во четвртата 4mL раствор од белка.

Во првата епрувета се формира нестабилна емулзија што за кратко време се одделува во два слоја.

Во втората епрувета емулзијата е постабилна и зависи од количеството и видот на слободни масни киселини во маслото.

Стабилни емулзии се добиваат во епруветите со раствор на белка и сапун.

## ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ

РАСТВОРЛИВОСТ НА ЛИПИДИТЕ. КВАЛИТАТИВНО ДОКАЖУВАЊЕ НА ХОЛЕСТЕРОЛ СПОРЕД  
SALKOWSKI

Доц. д-р Татјана Рушковска

---

### 7.2. КВАЛИТАТИВНО ДОКАЖУВАЊЕ НА ХОЛЕСТЕРОЛ СПОРЕД SALKOWSKI

#### Принцип

Холестеролот во присуство на концентрирана сулфурна киселина се дехидрира, губи еден молекул вода и преминува во 3,4- и 5,6- холестадиен, соединение со две двојни врски и со црвена боја.

#### Реагенси и прибор

1. Холестерол во прав
2. Хлороформ
3. Концентрирана сулфурна киселина
4. Епрувети, лабораториска лажица

#### Постапка

Во сува епрувета се става малку холестерол во прав и се раствора во 1 до 2 mL хлороформ. Од друга епрувета, внимателно, по сидот, се додава концентрирана сулфурна киселина во епруветата каде се наоѓа растворот на холестерол во хлороформ. На допирната површина се формира црвен прстен од холестадиен.



## ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ

ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЈАТА НА ВКУПЕН ХОЛЕСТЕРОЛ ВО СЕРУМ (ЕНЗИМСКА КВАНТИТАТИВНА МЕТОДА)

Доц. д-р Татјана Рушковска

---

# 8. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЈАТА НА ВКУПЕН ХОЛЕСТЕРОЛ ВО СЕРУМ (ЕНЗИМСКА КВАНТИТАТИВНА МЕТОДА)

---

### Принцип на методата:

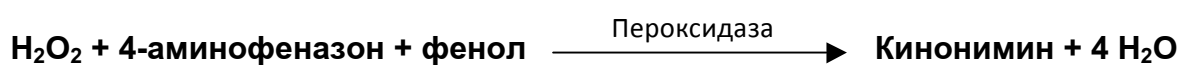
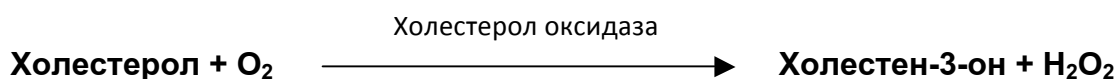
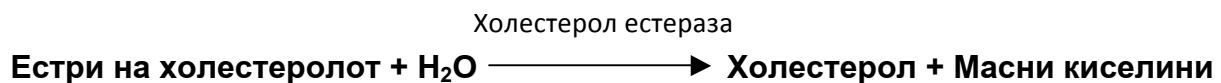
Холестеролот се определува после ензимска хидролиза и оксидација.

Во оваа постапка естрите на холестеролот од примерокот се хидролизираат со ензимот холестерол естераза (CHE).

Слободниот холестерол што се создава со оваа реакција заедно со слободниот холестерол од серумскиот примерок, се оксидираат со ензимот холестерол оксидаза (CHO) до холестен-3-он, при што се ослободува и водород пероксид ( $H_2O_2$ ).

$H_2O_2$  понатаму реагира со 4-аминофеназон (p-диметил аминокантипирин) и фенол во присуство на ензимот пероксидаза (POD) и се добива кинонимин со црвена боја.

Интензитетот на обојувањето е право пропорционален со концентрацијата на холестеролот и се мери спектрофотометриски на 500 nm.



**ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ****ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЈАТА НА ВКУПЕН ХОЛЕСТЕРОЛ ВО СЕРУМ (ЕНЗИМСКА  
КВАНТИТАТИВНА МЕТОДА)**

Доц. д-р Татјана Рушковска

**Состав на реагенсот:****RGT:**

Фосфатен пуфер (pH 6,5)	100 mmol/L
4-аминофеназон	0,3 mmol/L
Фенол	5 mmol/L
Пероксидаза	> 5 kU/L
Холестеролестераза	>150 U/L
Холестеролоксидаза	>100 U/L
Натриум азид	0,05%

**STD:**

Холестерол	200 mg/dL односно 5,17 mmol/L
------------	-------------------------------

**Подготовка и стабилност на реагенсите:**

Реагенсот и стандардот ги добиваме во готова форма како комплет од реагенси - кит.

Реагенсите се стабилни сè до истекот на рокот на траење, дури и после отворањето, кога се чуваат на 2...8°C. Отворениот реагенс е стабилен до две недели на 15...25°C. При работа со нив **мора**ме да ја одбегнеме контаминацијата.

**Примерок:**

Серум, хепаринизирана или EDTA - плазма.

*Забелешка:* Липемичните примероци создаваат турбидност на реакционата смеса што може да даде лажно покачен резултат. Овој тест избегнува такви лажно покачени резултати со помош на липид отстранувачкиот фактор (LCF – lipid clearing factor). Овој фактор го избиструва вкупниот турбидитет предизвикан од липемичниот примерок.

**Постапка:**

Бранова должина:	500 nm
Должина на киветата:	1 cm
Температура:	20...25°C или 37°C

**ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ****ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЈАТА НА ВКУПЕН ХОЛЕСТЕРОЛ ВО СЕРУМ (ЕНЗИМСКА КВАНТИТАТИВНА МЕТОДА)**

Доц. д-р Татјана Рушковска

**Шема за пипетирање:**

	Слепа проба	Стандард	Примерок
<b>Стандард (std)</b>	/	<b>10 µL</b>	/
<b>Примерок</b>	/	/	<b>10 µL</b>
<b>Реагенс (rgt)</b>	<b>1000 µL</b>	<b>1000 µL</b>	<b>1000 µL</b>

Се промешува и се инкубира 10 минути на температура од 20-25°C, или 5 мин на температура од 37°C. Се мери апсорбацијата на примерокот ( $\Delta A_{\text{примерок}}$ ) и на стандардот ( $\Delta A_{\text{стандард}}$ ) наспроти слепата проба за време од најмногу 60 минути.

**Пресметување на концентрацијата на холестерол:**

$$C = 200 \times \frac{\Delta A_{\text{примерок}}}{\Delta A_{\text{стандард}}} \text{ [mg/dl]}$$

или

$$C = 5.17 \times \frac{\Delta A_{\text{примерок}}}{\Delta A_{\text{стандард}}} \text{ [mmol/l]}$$

**Карактеристики на методата:**

Тестот за концентрацијата на холестерол е линеарен во граници до 750 mg/dL (19,3 mmol/L).

Примероците со повисока концентрација на холестерол се разредуваат 1 + 2 со физиолошки раствор (0,9% NaCl) и се повторува определувањето на концентарцијата. Резултатот се множи со 3.

**Референтни вредности:**

Референтните вредности според АНА – American Heart Association се:  
4,1 – 5,2 mmol/L

## ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ

### ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЈАТА НА ВКУПЕН ХОЛЕСТЕРОЛ ВО СЕРУМ (ЕНЗИМСКА КВАНТИТАТИВНА МЕТОДА)

Доц. д-р Татјана Рушковска

---

#### Забелешка:

1. Врз тестот не влијае на концентарцијата на хемоглобин, дури и до 200 mg/dL, ниту вредностите од билирубин до 5 mg/dL.
2. Реагенсите содржат натриум азид како конзерванс (0,05%). Да не се голта. Да се избегнува контакт со кожа и слузави мембрани.

Human, протокол број SU-CHOL INF 1001701 GB 07-2007-19

#### Нумеричка вежба:

1. Пресметај ја концентрацијата на холестерол во серум доколку при мерењата се добиени следните резултати:

A слепа проба = 0,0015

C стандард = 5,17 mmol/L

A стандард = 0,3186

A анализа = 0,6854

Резултат: \_\_\_\_\_

## ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ

ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЈАТА НА ТРИАЦИЛГЛИЦЕРОЛИ ВО СЕРУМ (ЕНЗИМСКА КВАНТИТАТИВНА МЕТОДА)

Доц. д-р Татјана Рушковска

---

# 9. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЈАТА НА ТРИАЦИЛГЛИЦЕРОЛИ ВО СЕРУМ (ЕНЗИМСКА КВАНТИТАТИВНА МЕТОДА)

---

### Принцип на методата:

Оваа постапка се базира на серија од неколку ензимски реакции.

1. Триацилглицеролите во примерокот за испитување најпрво се хидролизираат со помош на липази до глицерол и слободни масни киселини.
2. Глицеролот потоа се фосфорилира со АТФ (аденозин трифосфат) во присуство на ензимот глицерол киназа (GK) при што се добива глицерол-3-фосфат и ADP.
3. Глицерол-3-фосфатот се оксидира со молекуларен кислород во присуство на ензимот **глицерол фосфат оксидаза (GPO)** при што се ослободува  $H_2O_2$  и дихидроксиацетон фосфат.
4.  $H_2O_2$  врши оксидативно поврзување на 4-хлорофенол и 4-аминоантипирин [односно **p-аминоантипирин (PAP)**], реакција која е катализирана од ензимот пероксидаза (POD), при што се добива црвено обоен кинонимин со максимална апсорпција на 500 nm.

Интензитетот на обојувањето се мери спектрофотометриски. Апсорбанцијата е право пропорционална со концентрацијата на триацилглицероли во примерокот.

## ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ

### ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЈАТА НА ТРИАЦИЛГЛИЦЕРОЛИ ВО СЕРУМ (ЕНЗИМСКА КВАНТИТАТИВНА МЕТОДА)

Доц. д-р Татјана Рушковска

#### Состав на реагенсот:

#### RGT:

PIPES пуфер	50 mmol/L
4-хлорофенол	5 mmol/L
4-аминофеназон	0,25 mmol/L
Mg-јони	4,5 mmol/L
АТР	2 mmol/L
Липази	≥1300 U/L
Пероксидаза	≥ 500 U/L
Глицеролкиназа	≥400 U/L
Глицерол-3-фосфат оксидаза	≥1500 U/L

#### STD:

Триацилглицероли 200 mg/dL или 2,28 mmol/L

#### Подготовка и стабилност на реагенсите:

Реагенсот и стандардот ги добиваме во готова форма како комплет од реагенси - кит.

Тие се стабилни сè до истекот на рокот на траење, дури и после отворањето, кога се чуваат на 2...8°C.

Отворениот реагенс е стабилен до 4 недели на 20...25°C.

При работа со нив **мора да ја одбегнеме контаминацијата**.

Реагенсот и стандардот мора да се заштитени од светлина.

#### Примерок:

Серум, хепаринизирана или EDTA - плазма.

Стабилност на примерокот за анализа: 3 дена доколку се чува на 2-8°C, или 4 месеци чуван на -20°C.

*Забелешка:* Липемичните примероци создаваат турбидност на реакционата смеса што може да даде лажно покачен резултат. Овој тест избегнува такви лажно покачени резултати со помош на липид отстранувачкиот фактор (LCF – lipid clearing factor). Овој фактор го избиструва вкупниот турбидитет предизвикан од липемичниот примерок.

## ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ

### ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЈАТА НА ТРИАЦИЛГЛИЦЕРОЛИ ВО СЕРУМ (ЕНЗИМСКА КВАНТИТАТИВНА МЕТОДА)

Доц. д-р Татјана Рушковска

#### Постапка:

Бранова должина: 500 nm  
 Должина на патека: 1 cm  
 Температура: 20...25°C или 37°C

#### Шема за пипетирање:

	Слепа проба	Стандард	Примерок
Стандард (std)	/	10 µL	/
Примерок	/	/	10 µL
Реагенс (rgt)	1000 µL	1000 µL	1000 µL

Се промешува и се инкубира 10 минути на температура од 20-25°C, или 5 минути на температура 37°C. Се мери апсорбанцијата на примерокот ( $\Delta A_{\text{примерок}}$ ) и на стандардот ( $\Delta A_{\text{стандард}}$ ) наспроти слепата проба за време од најмногу 60 минути.

#### Пресметување на концентрацијата на триацилглицероли:

$$C = 200 \times \frac{\Delta A_{\text{примерок}}}{\Delta A_{\text{стандард}}} \quad [\text{mg/dl}]$$

$$C = 2.28 \times \frac{\Delta A_{\text{примерок}}}{\Delta A_{\text{стандард}}} \quad [\text{mmol/l}]$$

#### Карактеристики на методата:

Тестот за одредување на концентрацијата на триацилглицероли е линеарен во граници до 1000 mg/dL (11,4 mmol/L). Примероците со повисока концентрација се разредуваат 1 + 4 со физиолошки раствор (0,9% NaCl) и се повторува определувањето на концентарцијата. Резултатот се множи со 5.

## ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ

### ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЈАТА НА ТРИАЦИЛГЛИЦЕРОЛИ ВО СЕРУМ (ЕНЗИМСКА КВАНТИТАТИВНА МЕТОДА)

Доц. д-р Татјана Рушковска

---

#### Референтни вредности:

Референтните вредности според АНА – American Heart Association се:  
0,3 – 1,7 mmol/L

#### Забелешки:

1. За да се изврши корекција за вредноста за слободниот глицерол од измерената вредност за триацилглицеролите треба да се одземе 10 mg/dL, односно 0,11 mmol/L.
2. Хемоглобинот во концентрација до 150 mg/dL и билирубинот во концентрација до 40 mg/dL не интерферираат со тестот. Аскорбинската киселина во концентрација над 4 mg/dL може да даде лажно пониски вредности на триацилглицеролите.
3. Реагенсите содржат натриум азид како конзерванс (0,05%). Да не се голта. Да се избегнува контакт со кожа и слузави мембрани.

Human, протокол број SU-TRIMR INF 1072401 GB 02-2009-11

#### Нумеричка вежба:

1. Пресметај ја концентрацијата на триацилглицероли во серум доколку, при мерењата се добиени следните резултати:

A слепа проба = 0,0023

C стандард = 2,28 mmol/L

A стандард = 0,1276

A анализа = 0,8752

Резултат: \_\_\_\_\_



## ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ

ФЕЛИНГОВА ПРОБА. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЈАТА НА ГЛИКОЗА ВО СЕРУМ СО GOD-PAP МЕТОДА (ЕНЗИМСКА КВАНТИТАТИВНА МЕТОДА)

Доц. д-р Татјана Рушковска

---

# 10. ФЕЛИНГОВА ПРОБА. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЈАТА НА ГЛИКОЗА ВО СЕРУМ СО GOD-PAP МЕТОДА (ЕНЗИМСКА КВАНТИТАТИВНА МЕТОДА)

---

## 10.1. ФЕЛИНГОВА ПРОБА

Фелинговата проба е најпознатата **квалитативна** метода за докажување на гликоза. Порано се користела за докажување на присуството на гликоза во урината.

### Принцип

Познато е дека гликозата во својата молекула поседува алдехидна група што лесно се оксидира до карбоксилна група. Поради тоа гликозата делува како силно редуциционно средство.

Од друга страна, во присуство на редуциционно средство, двовалентниот бакар ( $\text{Cu}^{2+}$ ) од Фелинговиот раствор се редуцира до едновалентен ( $\text{Cu}^+$ ). Притоа се забележува промена на бојата на растворот од сина, преку зелена до црвено-керамидеста, што е знак за присуство на гликоза, односно позитивна проба.

Реакцијата не е специфична само за гликозата, туку сите супстанции што делуваат како редуцициони средства даваат позитивна Фелингова проба. Поради тоа нејзината примена во клиничката пракса е напуштена и истата е заменета со специфични, ензимски методи.

## ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ

ФЕЛИНГОВА ПРОБА. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЈАТА НА ГЛИКОЗА ВО СЕРУМ СО GOD-PAP МЕТОДА (ЕНЗИМСКА КВАНТИТАТИВНА МЕТОДА)

Доц. д-р Татјана Рушковска

---

### Реагенси и прибор

1. Гликоза, 20 g/L
2. Фелингов реагенс (Fehling I и Fehling II)
  - а) Состав на растворот Fehling I:  
 $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , 70 g/L
  - б) Состав на растворот Fehling II:  
Калиум натриум тартарат  $\times 4\text{H}_2\text{O}$ , 350 g/L и  
NaOH, 100 g/L
3. Епрувети, пипети, шпиритусна ламба

### Постапка

Во една епрувета се става по 1 mL раствор на Fehling I и Fehling II. Содржината се помешува и се загрева до вриење.

Во друга епрувета се става 2 mL раствор на гликоза и исто така се загрева до вриење.

Потоа, содржината од епруветата со Фелинговите раствори се префрла во епруветата со раствор на гликоза.

Се забележува промена на бојата на растворот од сина, преку зелена до црвено-керамидеста боја. Црвено-керамидестата боја потекнува од талогот од  $\text{Cu}_2\text{O}$  и е знак за позитивна проба, односно присуство на гликоза.

Ако наместо раствор на гликоза употребиме дестилирана вода и пробата ја изведеме на ист начин, бојата на растворот нема да се промени, што значи дека пробата е негативна.

**ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ**

ФЕЛИНГОВА ПРОБА. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЈАТА НА ГЛИКОЗА ВО СЕРУМ СО GOD-PAP МЕТОДА (ЕНЗИМСКА КВАНТИТАТИВНА МЕТОДА)

Доц. д-р Татјана Рушковска

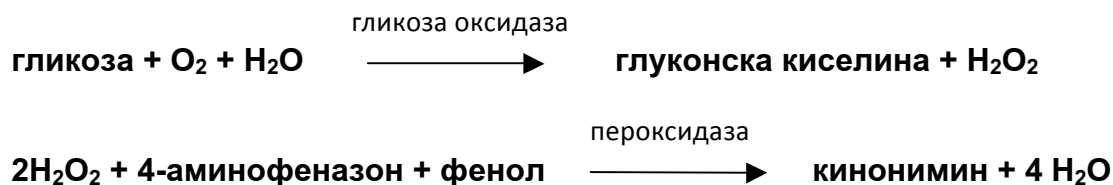
---

## 10.2. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЈАТА НА ГЛИКОЗА ВО СЕРУМ СО GOD-PAP МЕТОДА (ЕНЗИМСКА КВАНТИТАТИВНА МЕТОДА)

### Принцип на методата:

Според оваа метода концентрацијата на гликоза се определува после нејзината ензимска оксидација под дејство на ензимот гликоза оксидаза.

Ослободениот водороден пероксид од оваа реакција под каталитичко дејство на ензимот пероксидаза, во присуство на фенол и 4-аминофеназон развива црвено обојување од соединението кинонимин. Концентрацијата на гликоза е право пропорционална со интензитетот на обојување на растворот.



### Состав на реагенсот:

#### RGT:

Фосфатен пуфер (pH 7,5)	0,1 mol/L
4-аминофеназон	0,25 mmol/L
Фенол	0,75 mmol/L
Гликоза оксидаза	> 15 KU/L
Пероксидаза	> 1,5 KU/L
Мутаротаза	> 2,0 KU/L
Стабилизатори	

#### STD:

Гликоза	100 mg/dL односно 5,55 mmol/L
---------	-------------------------------

**ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ****ФЕЛИНГОВА ПРОБА. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЈАТА НА ГЛИКОЗА ВО СЕРУМ СО GOD-PAP МЕТОДА (ЕНЗИМСКА КВАНТИТАТИВНА МЕТОДА)**

Доц. д-р Татјана Рушковска

**Подготовка и стабилност на реагенсите:**

*Реагенсот и стандардот ги добиваме во готова форма како комплет од реагенси - кит.*

Реагенсот е стабилен сè до истекот на рокот на траење, дури и после отворањето, ако се чува на 2...8°C. На температура од 15...25°C реагенсот е стабилен до две недели. При работа **мораеме да ја одбегнеме контаминацијата.**

**Примерок:**

Серум, плазма.

Гликозата е стабилна до 24 часа кога примерокот се чува на 2...8°C, доколку серумот или плазмата се одвоени до 30 минути по земањето на крвта.

**Постапка:**

Бранова должина:	500 nm
Должина на киветата:	1 cm
Температура:	20...25°C или 37°C

**Шема за пипетирање:**

	Слепа проба	Стандард	Примерок
<b>Стандард (std)</b>	/	<b>10 µL</b>	/
<b>Примерок</b>	/	/	<b>10 µL</b>
<b>Реагенс (rgt)</b>	<b>1000 µL</b>	<b>1000 µL</b>	<b>1000 µL</b>

Се промешува и се инкубира 10 минути на температура од 20-25°C, или 5 минути на температура од 37°C. Се мери апсорбанцијата на примерокот ( $\Delta A_{\text{примерок}}$ ) и на стандардот ( $\Delta A_{\text{стандард}}$ ) наспроти слепата проба за време од најмногу 60 минути.

## ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ

ФЕЛИНГОВА ПРОБА. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЈАТА НА ГЛИКОЗА ВО СЕРУМ СО GOD-PAP МЕТОДА (ЕНЗИМСКА КВАНТИТАТИВНА МЕТОДА)

Доц. д-р Татјана Рушковска

---

### Пресметување на концентрацијата на гликоза:

$$c = 100 \times \frac{\Delta A_{\text{примерок}}}{\Delta A_{\text{стандард}}} \text{ [mg/dl]} \quad \text{или} \quad c = 5.55 \times \frac{\Delta A_{\text{примерок}}}{\Delta A_{\text{стандард}}} \text{ [mmol/l]}$$

### Карактеристики на методата:

Тестот е линеарен во граници до 400 mg/dL (22,2 mmol/L). Примероците со повисока концентрација на гликоза се разредуваат 1 + 2 со физиолошки раствор (0,9% NaCl) и се повторува определувањето на концентарцијата. Резултатот се множи со 3.

### Референтни вредности:

Во серум или плазма (на гладно): 75-115 mg/dL или 4,2-6,4 mmol/L

(Забелешка: Производителите на реагенсите во протоколите за изработка на анализите даваат свои референтни вредности кои можат да се разликуваат од референтните вредности кои се дадени во протоколите на други производители. Овде е дадена референтната вредност од производителот Human, протокол број SU-GLLQ2 INF 1026002 GB 07-2008-19.)

### Забелешка:

1. Иктеричните примероци може да интерферираат со тестот и затоа треба да се избегнуваат.
2. Врз тестот не влијае концентрацијата на хемоглобин, дури и до 500 mg/dL, концентрација на триацилглицероли до 2500 mg/dL, ниту вредностите од аскорбинска киселина до 20 mg/dL.

## ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ

ФЕЛИНГОВА ПРОБА. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЈАТА НА ГЛИКОЗА ВО СЕРУМ СО GOD-PAP МЕТОДА (ЕНЗИМСКА КВАНТИТАТИВНА МЕТОДА)

Доц. д-р Татјана Рушковска

---

### Нумеричка вежба:

1. Пресметај ја концентрацијата на гликоза во серум, доколку при одредување со GOD-PAP методата, после мерењата се добиени следните резултати:

A слепа проба = 0,0023

C стандард = 5,55 mmol/L

A стандард = 0,4005

A анализа = 0,6854

Резултат: \_\_\_\_\_

**ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ**

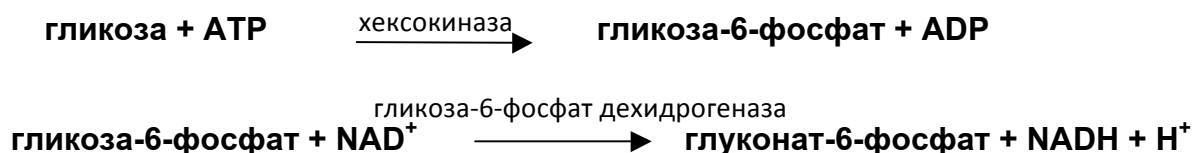
ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЈАТА НА ГЛИКОЗА ВО СЕРУМ СО МЕТОДА СО ХЕКСОКИНАЗА (ЕНЗИМСКА КВАНТИТАТИВНА МЕТОДА)

Доц. д-р Татјана Рушковска

# 11. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЈАТА НА ГЛИКОЗА ВО СЕРУМ СО МЕТОДА СО ХЕКСОКИНАЗА (ЕНЗИМСКА КВАНТИТАТИВНА МЕТОДА)

**Принцип на методата:**

Според оваа метода концентрацијата на гликоза се определува после нејзината фосфорилација до гликоза-6-фосфат под дејство на ензимот хексокиназа, во присуство на АТФ како донатор на фосфат. Понатаму, под каталитичкото дејство на ензимот гликоза-6-фосфат дехидрогеназа и во присуство на коензимот  $\text{NAD}^+$ , гликоза-6-фосфатот се оксидира до глуконат-6-фосфат, при што коензимот  $\text{NAD}^+$  се редуцира до  $\text{NADH} + \text{H}^+$ . Порастот на апсорбанцијата како резултат на создавањето на  $\text{NADH} + \text{H}^+$  е право пропорционален со концентрацијата на гликоза во примерокот.

**Состав на реагенсот:****RGT:**

PIPES пуфер (pH 7,6)	100 mmol/L
АТФ	4,7 mmol/L
NAD	3,1 mmol/L
$\text{Mg}^{++}$	4,9 mmol/L
Хексокиназа	> 1,5 U/mL
Гликоза-6-фосфат дехидрогеназа	> 1,5 U/mL
Натриум азид	0,05%

**ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ****ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЈАТА НА ГЛИКОЗА ВО СЕРУМ СО МЕТОДА СО ХЕКСОКИНАЗА (ЕНЗИМСКА КВАНТИТАТИВНА МЕТОДА)**

Доц. д-р Татјана Рушковска

**STD:**

Гликоза 100 mg/dL односно 5,55 mmol/L

**Подготовка и стабилност на реагенсите:***Реагенсот и стандардот ги добиваме во готова форма како комплет од реагенси - **kit**.*Реагенсот е стабилен сè до истекот на рокот на траење, дури и после отворањето, ако се чува на 2...8°C. На температура од 15...25°C реагенсот е стабилен до две недели. Реагенсот треба да се чува заштитен од светлина. При работа **мора да ја одбегнеме контаминацијата.****Примерок:**

Серум, плазма.

Гликозата е стабилна до 24 часа кога примерокот се чува на 2...8°C, доколку серумот или плазмата се одвоени до 30 минути по земањето на крвта.

**Постапка:**

Бранова должина:	340 nm
Должина на киветата:	1 cm
Температура:	20...25°C или 37°C

**Шема за пипетирање:**

	Слепа проба	Стандард	Примерок
Стандард (std)	/	10 µL	/
Примерок	/	/	10 µL
Реагенс (rgt)	1000 µL	1000 µL	1000 µL

Се промешува и се инкубира 10 минути на температура од 20-25°C, или 5 минути на температура од 37°C. Се мери апсорбанцијата на примерокот ( $\Delta A_{\text{примерок}}$ ) и на стандардот ( $\Delta A_{\text{стандард}}$ ) наспроти слепата проба за време од најмногу 30 минути.**Пресметување на концентрацијата на гликоза:**

$$c = 100 \times \frac{\Delta A_{\text{примерок}}}{\Delta A_{\text{стандард}}} \text{ [mg/dl]} \quad \text{или} \quad c = 5.55 \times \frac{\Delta A_{\text{примерок}}}{\Delta A_{\text{стандард}}} \text{ [mmol/l]}$$



## **ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ**

ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЈАТА НА ГЛИКОЗА ВО СЕРУМ СО МЕТОДА СО ХЕКСОКИНАЗА (ЕНЗИМСКА КВАНТИТАТИВНА МЕТОДА)

Доц. д-р Татјана Рушковска

---

### **Карактеристики на методата:**

Тестот е линеарен во граници до 1000 mg/dL (55,5 mmol/L).

### **Референтни вредности:**

Во серум или плазма (на гладно):        75-115 mg/dL        или        4,2-6,4 mmol/L

(Забелешка: Производителите на реагенсите во протоколите за изработка на анализите даваат свои референтни вредности кои можат да се разликуваат од референтните вредности кои се дадени во протоколите на други производители. Овде е дадена референтната вредност од производителот Human, протокол број SU-GLUV3 INF 1078601 GB 10-2008-11.)

### **Забелешка:**

1. Реагенсот содржи натриум азид како конзерванс. Да не се голта! Да се избегнува контакт со кожа и мукозни мембрани!
2. Иктеричните примероци може да интерферираат со тестот и затоа треба да се избегнуваат.
3. Светло кафеав талог може да се јави на дното од реагенсот. Неговата појава не пречи на активноста на реагенсот, но истиот не треба да се користи во реакционата смеса.

## ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ

### ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЈАТА НА ГЛИКОЗА ВО СЕРУМ СО МЕТОДА СО ХЕКСОКИНАЗА (ЕНЗИМСКА КВАНТИТАТИВНА МЕТОДА)

Доц. д-р Татјана Рушковска

---

#### Нумеричка вежба:

Пресметај ја концентрацијата на гликоза во серум, доколку при одредување со методата со хексокиназа, после мерењата се добиени следните резултати:

A слепа проба = 0,0035

C стандард = 5,55 mmol/L

A стандард = 0,5214

A анализа = 0,9671

Резултат: \_\_\_\_\_

Дали резултатот е во опсегот на линеарноста на методата?

## ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ

ПРИРАЧЕН ГЛИКОМЕТАР. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ГЛИКОЗА И КЕТОНСКИ ТЕЛА ВО УРИНА СО ТЕСТ-ЛЕНТИ

Доц. д-р Татјана Рушковска

---

# 12. ПРИРАЧЕН ГЛИКОМЕТАР. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ГЛИКОЗА И КЕТОНСКИ ТЕЛА ВО УРИНА СО ТЕСТ-ЛЕНТИ

---

## 12.1. ПРИРАЧЕН ГЛИКОМЕТАР

Во практиката за определување на концентрацијата на гликоза во крвта се користат и прирачни гликометри што работат на принципот на сува хемија. Анализата се изведува на тој начин што капка полна крв се капнува на тест-лентата на која се нанесени потребните реагенси во сува состојба, потоа тест лентата се внесува во апаратот и по извесно време на дисплејот се отчитува резултатот.

Употребата на прирачните гликометри е оправдана во болничките установи за брзо ориентационо одредување на концентрацијата на гликоза во крвта во ургентни состојби, на самото одделение, практично веднаш до болничкиот кревет, без да се губи време за транспорт на крвта до лабораторијата, за обработка на примерокот и за изработка на анализата.

Прирачните гликометри се користат и во домашни услови овозможувајќи им на пациентите заболени од Diabetes mellitus редовно следење на гликемијата.

Она што е особено важно во однос на прирачните гликометри е неопходноста од **редовно контролирање на нивната исправност и точноста на резултатите.**

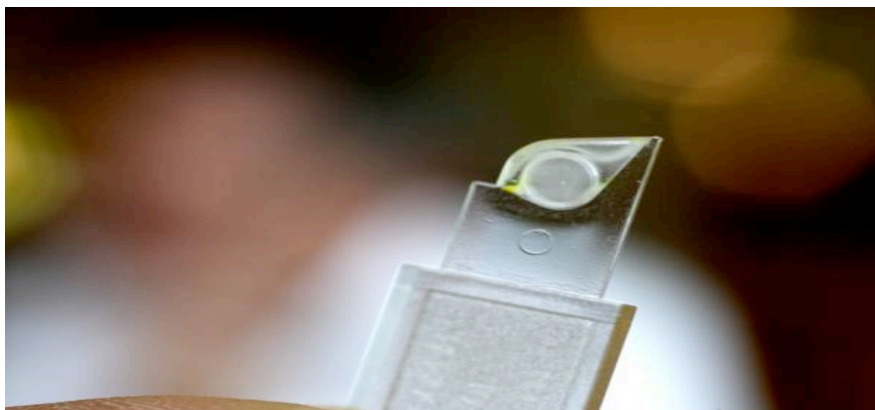
Во последно време можат да се набават прирачни гликометри кои наместо тест-лента користат реакциона кивета за еднократна употреба која ги содржи сите потребни реагенси за изведување на анализата, во сува состојба. Овие гликометри се одликуваат со особено висока точност и прецизност кои се споредливи со оние на биохемиските анализатори.

## ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ

### ПРИРАЧЕН ГЛИКОМЕТАР. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ГЛИКОЗА И КЕТОНСКИ ТЕЛА ВО УРИНА СО ТЕСТ-ЛЕНТИ

Доц. д-р Татјана Рушковска

---



**Кивета за еднократна употреба за прирачен гликометар**



**Начин на мерење на гликоза во капиларна крв со прирачен гликометар**

[http://www.youtube.com/watch?v=\\_lv2yTtT4WI&feature=related](http://www.youtube.com/watch?v=_lv2yTtT4WI&feature=related)

## ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ

ПРИРАЧЕН ГЛИКОМЕТАР. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ГЛИКОЗА И КЕТОНСКИ ТЕЛА ВО УРИНА СО ТЕСТ-ЛЕНТИ

Доц. д-р Татјана Рушковска

---

### 12.2. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ГЛИКОЗА И КЕТОНСКИ ТЕЛА ВО УРИНА СО ТЕСТ-ЛЕНТИ

Во нормални услови речиси целокупната гликоза од гломеруларниот филтрат се реапсорбира на ниво на проксималните тубули, така што во конечната урина кај здравите лица гликоза речиси не се среќава. Постои податок за референтни вредности за гликоза во урината кои изнесуваат од 0,1 – 0,8 mmol/L (биохемиски анализатор Olympus – метода со хексокиназа).

Меѓутоа, кога концентрацијата на гликоза во крвта ќе ја надмине вредноста од 11,0 mmol/L, доаѓа до надминување на тубуларниот капацитет за реапсорпција, па во урината се среќаваат зголемени концентрации на гликоза. Оваа појава се нарекува **гликозурија**. Вредноста на концентрацијата на гликоза во крвта над која се надминува тубуларниот капацитет за реапсорпција се нарекува “бубрежен праг”. Во различни учебници се среќаваат различни вредности за бубрежниот праг на гликозата кои се движат меѓу 9,0 и 11,0 mmol/L.

Гликозурија може да се јави и при пониски концентрации на гликоза во крвта од горенаведените, па дури и кај нормогликемични пациенти и во тој случај станува збор за т.н. **ренална гликозурија**, која е резултат на намален тубуларен капацитет за реапсорпција на гликозата.

За детектирање на **гликоза во урината** во современите клиничко-биохемиски лаборатории се користат тест-ленти што се дизајнирани по принципот на *сува хемија*. Тие се направени од пластична маса на која се нанесени квадратни парчиња хартија импрегнирана со реагенси во сува состојба. За секој аналит (гликоза, кетонски тела, билирубин, уробилиноген...) се користи специфична комбинација од реагенси. Конкретно, за одредување на гликоза во урина се најчесто се користи GOD-PAF методата, така што реагенс-хартијата за гликоза е импрегнирана со: гликоза оксидаза, пероксидаза и хромоген, кој се разликува кај тест-лентите од различни производители.

Анализата се изведува во промешана, нецентрифугирана урина, на тој начин што тест-лентата целосно се потопува во примерокот (приближно 2 секунди), потоа лентата се вади од примерокот, а вишокот урина се отстранува со провлекување на страничниот раб од тест-лентата по работ на чашката за урина. Лентата се остава во хоризонтална положба околу 1 минута, по што се врши споредување на интензитетот на обојувањето на реагенс-хартијата со шаблонот кој е даден на надворешниот дел од секое пакување на тест-ленти. Според тоа методата за одредување на гликоза во урина, исто како и методите за одредување на останатите аналити во урината со тест-ленти, е **семиквантитативна**.

## ОСНОВИ НА БИОХЕМИЈА - ВЕЖБИ

### ПРИРАЧЕН ГЛИКОМЕТАР. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ГЛИКОЗА И КЕТОНСКИ ТЕЛА ВО УРИНА СО ТЕСТ-ЛЕНТИ

Доц. д-р Татјана Рушковска

Садот во кој се остава примерокот од урина треба да биде чист, сув и да нема остатоци од детергенти (поради можни интерференции). Урината треба да се анализира веднаш, а најдоцна за 2 часа. Полињата хартија со импрегниран реагенс не смеат да се допираат со раце.



#### Определување на гликоза и кетонски тела во урина со тест-ленти

На ист начин, со користење на тест ленти, се детектираат и **кетонските тела во урината**. Методата се заснова на принципот на реакција на ацетонот и на ацетоцетната киселина со натриум нитропрусид, при што се добива виолетово обојување.  $\beta$ -Хидроксибутерната киселина не реагира со натриум нитропрусидот.

Денеска современите лаборатории поседуваат анализатори за автоматско читање на тест-лентите. На следната слика е прикажан еден таков анализатор.



#### Апарат за автоматско читање на тест-лентите за урина

# Литература

---

1. „ПРАКТИКУМ ПО ОПШТА БИОХЕМИЈА – за студенти по фармација“, Бојана Тодорова, Гордана Босилкова, Марија Крстевска, Петраки Корнети, Снежана Трајковска и Слобода Џекова-Стојкова, Катедра за медицинска и експериментална биохемија, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Скопје, Инфопрес, Скопје, 1997.
2. „БИОХЕМИСКИ МЕТОДИ“, Велимир Д. Стојковски, Елнат, Куманово, 1994.
3. „TIETZ, Fundamentals of Clinical Chemistry“, 6th edition, Saunders, Elsevier, 2008.
4. „КЛИНИЧКА ХЕМИЈА - принципи, процедури, корелации“, Бишоп, Фоди и Шоеф, петто издание, превод на македонски јазик, Просветно дело, Скопје, 2009.
5. „MEDICINSKA BIOHEMIJA“, Nada Majkić-Singh, drugo dopunjeno izdanje, Društvo medicinskih biohemičara Srbije, Beograd, 2006.
6. Протоколи за изработка на биохемиски анализи од компанијата HUMAN, Германија. <http://www.human.de/en/index.php>.