Минобрнауки России

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение

высшего образования

**«Оренбургский государственный университет»**

Кафедра биохимии и микробиологии

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ**

**К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ**

ДИСЦИПЛИНЫ

*«Биохимия водно-солевого гомеостаза»*

Уровень высшего образования

СПЕЦИАЛИТЕТ

Специальность

*06.05.01 Биоинженерия и биоинформатика*

(код и наименование специальности)

*Биоинженерия*

(наименование направленности (профиля)/специализации образовательной программы)

Квалификация

*Биоинженер и биоинформатик*

Форма обучения

*Очная*

Год набора 2024

Методические указания рассмотрены и утверждены на заседании кафедры

Кафедра биохимии и микробиологии

протокол № 7 от "15" февраля 2024г.

Заведующий кафедрой

Кафедра биохимии и микробиологии Е.С. Барышева

*наименование кафедры подпись расшифровка подписи*

*Исполнители:*

доцент Е.В.Бибарцева

*должность подпись расшифровка подписи*

зав кафедрой биохимии и микробиологии Е.С. Барышева

*должность подпись расшифровка подписи*№ регистрации   РП

**Содержание**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1. | Требования к результатам обучения по дисциплине | 4 |
| 2 | Методические указания к практическим занятиям | 4 |
| 2.1 | Практическое занятие № 1 Функции воды в организме. Состав и содержание внутри- и внеклеточной жидкости. | 4 |
| 2.2 | Практическое занятие № 2 Положительный и отрицательный водный баланс организма Расчет водного баланса организма | 5 |
| 2.3 | Практическое занятие № 3 Отеки: механизмы развития при недостаточности сердечно-сосудистой системы и болезнях почек.. | 7 |
| 2.4 | Практическое занятие № 4 Обмен натрия и калия. Гипернатриемия, её виды и механизмы развития. Относительная и абсолютная гипонатриемия. Гормональная регуляция выведения натрия почками..…… | 9 |
| 2.5 | Практическое занятие № 5 Роль ионов калия в мышечном сокращении, поддержании функций сердечно-сосудистой системы, почек. Гипер- и гипо-калиемия, клинические проявления. | 11 |
| 2.6 | Практическое занятие № 6 Кальций, гипер- и гипокальциемия у детей и взрослых. | 15 |

**1. Требования к результатам обучения по дисциплине**

Процесс изучения дисциплины направлен на формирование следующих результатов обучения:

Знать: фундаментальные основы, современные достижения и проблемы водного-электролитного баланса организма; роль водного-электролитного баланса организма в функционировании живых систем различного уровня организации; основные способы поиска актуальной информации по проблемам водно-солевого гомеостаза; основные механизмы нарушения обмена макро- и микроэлементов;

Уметь: излагать и критически анализировать базовую информацию о водно-электролитного баланса организма; высказывать, формулировать, выдвигать гипотезы о природе нарушений водно-электролитного баланса организма, об их проявлениях и последствиях; определять, находить, решать, вычислять, оценивать, измерять некоторые параметры, состояния, используя известные в оценке водно-электролитного баланса организма; выбирать способы, методы, приемы, алгоритмы, меры, средства, модели, законы, критерии для решения поддержания водно-электролитного гомеостаза; обобщать, интерпретировать полученные результаты по заданным или определенным критериям; контролировать, проверять, осуществлять самоконтроль до, в ходе и после выполнения работы; использовать полученные знания, навыки и умения в практической деятельности; использовать различные источники информации для поиска решения поставленной задачи; планировать самостоятельную работу и формировать отчеты по проведенной работе.

Владеть: основами теории и практики формирования и поддержания водно-электролитного гомеостаза; методами использования знаний о водно-солевом гомеостазе в решении медицинских, сельскохозяйственных и экологических проблем; навыками представления результатов лабораторных исследований водно-солевого гомеостаза; методическими приемами по написанию научных работ, оформлению мультимедийных презентаций с использованием ЭВМ.

**2 Методические указания к практическим занятиям**

**2.1 Практическое занятие № 1 Функции воды в организме. Состав и содержание внутри- и внеклеточной жидкости.**

Вопросы для подготовки:

1. Функции воды в организме.

2. Водные пространства организма.

3. Обмен воды в организме

4. Основные клинические симптомы гидратационных нарушений.

5. Состав и содержание внутри- и внеклеточной жидкости.

Вопросы и тесты для контроля знаний

1. Ежедневная потеря воды взрослым человеком (в литрах):

а) 4.5 л б) 3.5 л в) 0.8 л г) 2.5 л

2. Напряжение кислорода в артериальной крови (в мм рт.ст.):

а) 110-180 мм рт. ст. ) 96-100 мм рт. ст. в) 30 мм рт. ст. г) 60 мм рт. ст.

3. Процентное содержание общей воды организма у взрослого мужчины с

нормальным питанием:

а) 50% б) 40% в) 80% г) 60%

4. Возможные причины гипотонической дегидратации:

а) Потеря солей через почки б) Недостаточное введение натрия

в) Потеря жидкости тела, возмещаемая водой или безэлектролитными раство-рами

г) Болезнь Аддисона

5. Что следует применить для лечения гипотонической дегидратации:

а) 1 л 0.9% раствор NaCl б) 3% раствор КCl в) Лактасол г)5% раствор глюкозы

6. Ежедневное потребление воды взрослым человеком:

а) 2.5 л б) 0.8 л в) 4.5 л г) 3.5 л

7. У больного с черепно-мозговой травмой проводится ИВЛ: рН=7,58, рСО2=24 мм рт.ст., ВЕ = - 4мэкв/л. Оцените показатели КОС.

а) Компенсированный дыхательный алкалоз

б) Метаболический ацидоз

в) Декомпенсированный дыхательный алкалоз

г) Субкомпенсированный дыхательный алкалоз

д) Смешанный дыхательный алкалоз

8. После экстубации больной стал бледно-серого цвета рН=7,21, рСО2=78 мм рт. ст. Это указывает:

а) На дыхательный ацидоз б) На метаболический ацидоз

в) На гиповентиляцию г) На компенсированный дыхательный ацидоз

д) На смешанный дыхательный ацидоз

9. К гипертонической дегидратации приводит:

а) Потери изотонической жидкости б) Недостаточное поступление жидкости

в) Полиурия г) Потеря гипотонической жидкости

**2.2 Практическое занятие № 2 Положительный и отрицательный водный баланс организма Расчет водного баланса организма**

В нормальных условиях поступление воды в организм равно ее выделению.

При расчете водного баланса следует учитывать:

1. Поступление: энтеральное, парентеральное и эндогенная вода (200-300 мл/24 ч).

2. Физиологические потери:суточный диурез, выделение через легкие (500 мл/24 ч), кожу (500 мл/24 ч) и потери с калом — 150—200 мл.

При повышении температуры выше 37°С на каждый градус прибав¬ляют 500 мл.

3. Патологические потери: рвота, понос, свищи, дренажи, аспирация.

При расчете потребности организма в воде исходят из средней величины: 35—40 мл/1 кг массы тела/24 ч.

Водный баланс рассчитывают у больных за сутки в определенное время. Если количество введенной жидкости соответствует потерям, это трактуется как нулевой водный баланс, превышает потери — положительный и меньше потерь — отрицательный.

Методы определения водного баланса пациента

1. Метод взвешивания. Ежедневно измеряют массу тела больного при помощи медицинских весов. Эту процедуру следует выполнять всегда в одних и тех же (стандартных) условиях: утром, натощак, после опорожнения кишечника и мочевого пузыря, больной должен быть в одной и той же одежде. По изменению массы тела в течение определенного времени судят о водном балансе;

2. Метод, основанный на сопоставлении суточного диуреза и потребленной жидкости.

Цели: выявление скрытых отёков, определение количества выделенной за сутки мочи, оценка адекватности терапии, в первую очередь мочегонной (диуретической).

Оснащение: медицинские весы, чистая сухая 2-3-литровая банка, два градуированных сосуда, лист учёта водного баланса, температурный лист.

Порядок действий:

1. Накануне предупредить больного о предстоящей процедуре и правилах сбора мочи, дать ему подробную информацию о порядке записей в листе учёта водного баланса.

2. В 6 ч утра разбудить пациента, чтобы он помочился самостоятельно в унитаз, либо выпустить ему мочу катетером; эту порцию мочи не учитывают.

3. Все последующие порции мочи до 6 ч утра следующего дня включительно пациент должен собирать в банку.

4. В течение дня больной или медсестра ведут учёт введённой в организм жидкости в миллилитрах, включая выпитую (в том числе первые блюда - 75% жидкости, овощи и фрукты – 100% жидкости) и введённую парентерально.

5. С помощью градуированного сосуда подсчитать количество выделенной за сутки мочи.

6. Данные измерений занести в специальную графу температурного листа, или отдельный лист учета баланса жидкости и веса (таблица 4).

Оценка водного баланса

1. Подсчитать, какое количество жидкости должно выделиться с мочой. Количество мочи, которое должно выделиться (в норме), определяют по формуле: количество поступившей жидкости (включая не только содержание воды в пище, но и парентеральные растворы) умножают на 0,8 (80%).

2. Сравнить объём выделенной жидкости с ожидаемым количеством (вычисленным по формуле). Водный баланс расценивают как отрицательный, если жидкости выделено меньше, чем ожидают при расчёте по формуле, и как положительный – если жидкости выделено больше. Положительный водный баланс свидетельствует о схождении отёков и эффективности лечения, отрицательный – о нарастании отёков и неэффективности диуретической терапии (лечения мочегонными препаратами).

Таблица Лист учета баланса жидкости и веса

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Ф.И.О. пациента | | | | | |
| Дата | Введено в/вену | Выпито, съедено | Выделено | Баланс жидкости | Динамика веса |
|  |  |  |  |  |  |

Формулы расчета водного баланса

V = V1-V2

• V - суточный водный баланс;

• V1 - суточная потребность воды в организме;

• V2 - расчет суточного необходимого для введения количества воды.

V1 = 40m + 500k - x

V2 = 14,5m + 500k + d - 200

• m - масса пациента (кг);

• k - коэффициент температуры (k=t°C больного - 37°C):

при t≤37°C k=0 при t≥38°C k=1 при t≥39°C k=2 при t≥40°C k=3

• x - количество эндогенной воды (x=300 для взрослых; x=150 для детей);

• d - суточный диурез (мл)

Если V` = 0— нулевой водный баланс,

V`> 0 — положительный водный баланс,

V`< 0 — отрицательный водный баланс.

**2.3 Практическое занятие № 3 Отеки: механизмы развития при недостаточности сердечно-сосудистой системы и болезнях почек.**

Вопросы и тесты для контроля знаний

Развитию отеков способствуют

1. увеличение онкотического давления крови

2. уменьшение онкотического давления крови

3. повышение венозного давления

4. увеличение осмотического давления крови

Альбумин-глобулиновый индекс плазмы (при нормальном общем содержании белка) для возникновения гипоонкии должен

1. уменьшиться 2. увеличиться

Онкотический фактор играет ведущую роль в патогенезе следующих отеков

1. аллергических 2. Голодных 3. Токсических 4. нефротических

Мембраногенный фактор играет ведущую роль в патогенезе следующих отеков

1. сердечных 2. Аллергических 3. Токсических 4. нефротических

Гидростатическое давление является ведущим фактором в развитии следующих отеков

1. нефротических 2. Голодных 3. Застойных 4. сердечных

Пусковым фактором в развитии застойных отеков является

1. повышение гидростатического давления

2. гипопротеинемия 3. повышение проницаемости сосудов

4. увеличение осмотического давления крови

Пусковым фактором в развитии сердечных отеков является

1. повышение гидростатического давления 2. гипопротеинемия

3. повышение проницаемости сосудов

4. вторичный гиперальдостеронизм 5. снижение МОК

Ведущим фактором в развитии голодных отеков является

1. повышение гидростатического давления 2. гипопротеинемия

3. повышение проницаемости сосудов

4. увеличение осмотического давления крови

Ведущим фактором в развитии нефротических отеков является

1. повышение гидростатического давления 2. гипопротеинемия

3. повышение проницаемости сосудов

4. увеличение осмотического давления крови

Ведущим фактором в развитии аллергических отеков является

1. повышение гидростатического давления 2. гипопротеинемия

3. повышение проницаемости сосудов

4. увеличение осмотического давления крови

Ведущим фактором в развитии токсических отеков является

1. повышение гидростатического давления 2. гипопротеинемия

3. повышение проницаемости сосудов

4. увеличение осмотического давления крови

Ведущими факторами в развитии воспалительных отеков являются

1. повышение гидростатического давления в сосудистом русле

2. гипопротеинемия 3. повышение проницаемости сосудов

4. увеличение осмотического давления крови

5. повышение онкотического давления в тканях

6. повышение осмотического давления в тканях

Ведущим фактором в развитии нефритических отеков является

1. вторичный гиперальдостеронизм

2. снижение онкотического давления крови

3. повышение гидростатического давления в сосудистом русле

4. повышение проницаемости сосудистой стенки

Выработку альдостерона в надпочечниких стимулируют

1. гипернатриемия 2. Гипонатриемия 3. гиповолемия

4. гиперонкия 5. снижение почечного кровотока 6. гипокалиемия

7. гиперкалиемия

Повышение гидростатического давления крови является ведущим фактором развития всех отеков, кроме

1. воспалительных 2. Застойных 3. Токсических 4. сердечных

Снижение онкотического давления крови является ведущим фактором в развитии всех отеков, кроме

1. нефротических 2. Голодных 3. Воспалительных 4. при циррозе печени

Активация РААС является ведущим фактором патогенеза в развитии следующих отеков

1. воспалительных 2. Нефритических 3. сердечных

4. застойных 5. голодных

Увеличению фильтрации жидкости из сосудов в ткани способствуют

1. повышение коллоидно-осмотического давления в сосудах

2. повышение коллоидно-осмотического давления в тканях

3. повышение гидростатического давления в сосудах

4. повышение проницаемости сосудов 5. увеличение лимфооттока

Снижению резорбции жидкости из ткани в сосуд способствуют

1. повышение гидростатического давления в сосуде

2. повышение коллоидно-осмотического давления в ткани

3. снижение коллоидно-осмотического давления в сосуде

4. лимфостаз 5. повышение проницаемости сосудистой стенки

ОЦК при сердечных отеках

1. увеличивается 2. Уменьшается 3. не изменяется

Развитие отека легких является результатом недостаточности

1. левого желудочка 2. правого желудочка

Отеки конечностей развиваются при недостаточности

1. левого желудочка 2. правого желудочка

Наиболее типичная локализация почечных отеков

1. нижние конечности 2. Лицо 3. асцит

Снижение онкотического давления крови следует ожидать при

1. сердечной недостаточности 2. нефротическом синдроме

3. голодании 4. циррозе печени 5. аллергии

**2.4 Практическое занятие № 4 Обмен натрия и калия. Гипернатриемия, её виды и механизмы развития. Относительная и абсолютная гипонатриемия. Гормональная регуляция выведения натрия почками.**

Обмен натрия в организме

Общее количество натрия в организме около 105 граммов. Более 50 % - внеклеточная жидкость, в костях (депо) - 40%, внутриклеточное содержание 6 - 9%.

Физиологическая роль натрия:

1. Необходимо отметить, что натрий поддерживает осмотическое давление: замена другим осмотически активным катионом в концентрации, необходимой для поддержания осмолярности внеклеточной жидкости, не совместимо с жизнью.

2. Устанавливает движение воды, так 1 ммоль натрия удерживает около 6 мл воды.

3. Натрий принимает участие в регуляции КОС, так как он входит в состав буферных систем крови.

4. Определяет состояние нервно-мышечной возбудимости, тем что участвует в передаче возбуждения по нервно-мышечному волокну.

5. Поддерживает постоянство биоэлектрического потенциала мембран клеток: «калий-натриевый насос».

Потребность натрия для взрослых составляет 4 – 5 граммов в сутки, а для детей – 1 ммоль/кг массы тела.

Всасывание протекает наиболее активно в ободочной кишке. Оно усиливается при повышении концентрации в пище, при слабокислой рН – 4,4 – 6,8. Стимулируют всасывание: альдостерон, гидрокортизон, а угнетают: гастрин, холецистокинин, простогландины. Необходимо отметить, что натрий выводится с мочой, теряется 3-6 грамм в сутки (95%), а также с потом и калом – 5 %.

Уровень натрия в организме регулируют нервная, эндокринная и мочевыделительная системы. Основным гормоном регуляции служит альдостерон.

Клинико - диагностическое значение определения концентрации натрия: в плазме крови содержание натрия составляет 135-145 ммоль/л.

Уровень натрия в моче при разном пищевом режиме равен 40-220 ммоль/сут. Гипернатриемия – повышение концентрации натрия в сыворотке крови, наблюдается при состоянии сильного потоотделения, несахарном мочеизнурении при патологических процессах в гипоталамической области мозга, болезни и синдроме Кушинга. При заболеваниях почек патофизиологические процессы меняют обмен натрия. Когда протеинурия возникает в результате первичного поражения фильтрационного барьера почечных телец и скорость клубочковой фильтрации не изменена, развивается гипопротеинемия. При этом задержка натрия в почках - следствие снижения объёма крови. Если снижение скорости клубочковой фильтрации первично, задержка воды и соли ведёт к увеличению объёма крови и повышению АД. Возможно сочетание обоих патологических процессов. Увеличение натрия в сыворотке крови отмечается также при заболеваниях печени и при заболеваниях ЦНС.

Гипонатриемия – снижение уровня натрия в сыворотке крови, встречается в клинике значительно чаще, сопровождая разнообразные патологические состояния. Наиболее частая причина гипонатриемии - применение диуретиков. Большинство диуретических препаратов активирует экскрецию натрия с мочой. Последствием этого может быть снижение общего содержания натрия в организме и уменьшение внеклеточного водного пространства.

Низкая концентрация натрия в плазме крови характерна для заболеваний почек, при утрате их способности реабсорбировать катион из гломерулярного фильтрата. Это может привести к нарушению секреции воды. Гипонатриемия развивается также при застойной сердечной недостаточности, когда пациенты длительное время получают диуретические препараты. В начальных стадиях застойная сердечная недостаточность сопровождается гипонатриемией, вследствие активации секреции антидиуретического гормона.

Гипонатриемия характерна также и для патологии ЖКТ. Диарея может привести к снижению концентрации натрия в сыворотке и экстрацеллюлярной жидкости. Наличие илеостомы всегда сопровождается гипонатриемией. При циррозе печени, несмотря на высокое содержание натрия в организме, содержание его в плазме крови может быть снижено.

При первичной недостаточности надпочечников (болезнь Аддисона) альдостерон мало синтезируется это приводит к тому, что большое количество натрия выводится с мочой, что сопровождается развитием выраженной гипонатриемии. При сахарном диабете наличие кетоацидоза сопровождается усиленной потерей натрия в почках. В результате этого развивается гипонатриемия и снижение содержания натрия в организме. Гипонатриемия сопровождает выраженную гипергликемию.

**2.5 Практическое занятие № 5 Роль ионов калия в мышечном сокращении, поддержании функций сердечно-сосудистой системы, почек. Гипер- и гипокалиемия, клинические проявления.**

Калий (К+) – основной катион внутриклеточной жидкости; в ней содержится 98% калия всего организма. В организме человека с массой тела 70 кг содержится 3500 ммоль или 160 грамм калия. В клетках содержится 89-90% калия, в костях, соединительной ткани – 7,8 - 8%, в межклеточной жидкости – 1,8-2%, в плазме – 0,3-0,4%. Содержание калия в сыворотке крови – 3,6-5,3 ммоль/л, в эритроцитах – 79,9-99,3 ммоль/л. Депо калия в организме - мышечная ткань.

Физиологическая роль калия: калий поддерживает осмотическое давление внутри клетки, обеспечивает кислото-основной гомеостаз в клетке, участвует в обеспечении трансмембранной разности потенциалов (калийнатриевый насос), участвует в передаче возбуждения по нервно-мышечному волокну, принимает участие в синтезе белка, глюкозы, гликогена.

Потребность калия для взрослых в сутки составляет 50 - 102 ммоль, в организм человека калий поступает с растительной пищей. От 85 до 90% калия, принятого с пищей, выводят из организма почки. При отсутствии калия в пище в течение нескольких дней с мочой выделяется 40-60 ммоль/сут, после чего потеря калия с мочой уменьшается до 10-20 ммоль/сут. 10-15% потребленного с пищей калия выводится через ЖКТ.

Регуляция уровня калия почками: ионы калия легко диффундируют через фильтрационный барьер почечных телец. Далее 50-70% калия реабсорбируется в проксимальном (извитом) сегменте нефрона. Выведение калия - это результат сочетания процессов фильтрации, реабсорбции и секреции. В условиях гиперкалиемии в извитых канальцах подавляется реабсорбция калия.

Клинические наблюдения показали, что КОС, скорость протекания мочи по дистальному канальцу, действие минералокортикоидов, поступление нереабсорбируемых в дистальном канальце анионов бикарбоната при почечном канальцевом ацидозе, некоторые антибиотики, могут изменить электрохимический потенциал мембраны клеток извитого канальца и оказывают влияние на экскрецию калия. Регуляция калия альдостероном: известно, что альдостерон повышает поступление калия в клетки и выведение его с мочой, но при этом он контролирует реабсорбцию в дистальных канальцах. При недостаточности коры надпочечников выведение калия с мочой уменьшаетс и может развиться гиперкалиемия. В то же время при гиперактивности коры надпочечников (гиперальдостеронизме) усиленная реабсорбция натрия приведет к усиленному выделению калия и угрожающей гипокалиемии (2,4-1,6 ммоль/л).

Калий и КОС: немаловажное влияние на уровень калия в плазме крови оказывает нарушение рН крови. При метаболическом ацидозе ионы водорода перемещаются внутрь клетки в обмен на внутриклеточный калий, что приводит к тканевой гипокалиемии. При алкалозе, наоборот, развивается гиперкалиемия. На уровень калия в плазме влияет содержание в крови аниона НСО, отражающее степень катаболических процессов. Известно, что экскреция калия в почках имеет циркадный ритм, наименьшие ее значения отмечены в ночное время, что отражает ритм секреции глюкокортикоидов. Экскреция К+ повышается в ответ на нагрузку этим катионом. Гиперкалиемия приводит к повышению секреции альдостерона, а он в свою очередь определяет транспорт калия в почках, а также в толстой кишке, слюнных и потовых железах. Введение большой дозы глюкокортикоидов вызывает гипокалиемию и повышает калийурез, который продолжается значительно дольше действия стероидов.

Инсулин и калий: установлено, что увеличение концентрации инсулина в крови приводит к понижению содержания калия, что происходит в результате поглощения калия миоцитами скелетных и сердечной мышц, клетками печени и жировой ткани. При сахарном диабете гиперкалиемия развивается легче, чем в норме. Инсулин способствует накоплению внутриклеточного калия независимо от уровня глюкозы в крови. Гиперкалиемия в свою очередь активирует секрецию инсулина клетками островков Лангерганса. При снижении или повышении содержания калия в крови нарушается поступление в клетки глюкозы и аминокислот. Клинико - диагностическое значение определения концентрации калия: недостаточное потребление калия редко приводит к развитию гипокалиемии, повышенная экскреция калия почками - наиболее частая причина гипокалиемии. Выраженная гипокалиемия развивается в следующих ситуациях:

1) снижение поступления калия с пищей;

2) усиленная экскреция калия почками при приёме диуретиков, диуретическая фаза острой почечной недостаточности, гиперальдостеронизм, синдром и болезнь Кушинга; внепочечная потеря калия при диарее, профузной рвоте;

3) перераспределение калия между вне- и внутриклеточной жидкостью. При уменьшении концентрации калия в сыворотке крови происходит ослабление рефлексов, гипотония мышц, слабость и астения. Некоторые случаи гипокалиемии приводят к явлениям паралича и даже рабдомиолиза.

Ослабление тонуса гладкой мускулатуры при низком уровне калия может вызвать атонию желудка и парез кишечника, особенно на 2-3-й день послеоперационного периода.

Необходимо отметить, что выраженная гипокалиемия приводит к нарушению проводимости и ритма, что отражается на ЭКГ (уменьшение амплитуды зубцов, инверсия зубца Т, расширение интервала S-T и появление зубца Q).

При хроническом дефиците калия увеличиваются размеры сердца, возникают нарушения ритма, а при резком снижении уровня калия в плазме возможна остановка сердца в систоле.

Диагностика нарушения обмена калия: для того чтобы установить причину гипокалиемии необходимо провести подробный сбор анамнеза и результатов лабораторного исследования. В анамнезе обращают внимание на прием диуретиков, слабительных, препаратов лакрицы, рвоту, диарею, прием алкоголя.

При лабораторном обследовании определяют в плазме крови концентрацию калия и натрия, показатели КОС, концентрацию альдостерона и активность ренина. Определение в крови концентрации магния и кальция показано в случаях неясной причины гипокалиемии.

Гиперкалиемия - повышенное потребление калия с пищей редко приводит к гиперкалиемии, если при этом нет почечной или надпочечниковой недостаточности. Гиперкалиемия может развиваться в следующих случаях:

1) повышенное поступление калия (приём избытка калия при терапии диуретиками, переливание крови с просроченным сроком хранения);

2) перераспределение калия между водными пространствами (повреждение тканей, активация катаболических процессов, системный ацидоз);

3) снижение выведения калия (острая почечная недостаточность, хроническая почечная недостаточность, длительный приём калий сберегающих диуретиков, гипоальдостеронизм).

Гиперкалиемия при недостаточности надпочечников (болезнь Аддисона) сопровождается низким уровнем натрия в плазме крови, гипокалиурией, высокой активностью ренина. Нарушения метаболизма углеводов при острой и хронической почечной недостаточности провоцируют гиперкалиемию и метаболический алкалоз.

Признаки избытка калия: нейромышечные симптомы гиперкалиемии выражаются в парестезиях, а в более тяжелых случаях в восходящем параличе конечностей. Выраженность кардиальных симптомов зависит от степени повышения калия в плазме - от минимальных изменений на ЭКГ до серьезных нарушений ритма и проводимости (поперечная блокада и фибрилляция желудочков). При концентрации калия выше 6 ммоль/л, как правило, обнаруживают изменения на ЭКГ, которые становятся более тяжелыми. При концентрации калия выше 10 ммоль/л сердце может остановиться в диастоле. При уровне калия выше 7 ммоль/л могут развиться аритмии сердца с летальным исходом. Гиперкалиемия (более 5 ммоль/л) отмечена в большом проценте случаев у детей, родившихся недоношенными.

Ошибки исследования: клинические наблюдения показали, что основная причина высокого содержания калия в плазме крови - несоблюдение условий взятия крови. Наиболее частая ошибка - гемолиз. В ряде случаев при внутривенном введении калия по окончании инфузии из этой же иглы (катетера) берут кровь для исследования. В таких ситуациях лаборатория может определить содержание калия в плазме крови, превышающее 10 ммоль/л. Высокое количество тромбоцитов или лейкоцитов, что происходит при миелопролиферативных заболеваниях, может привести к псевдогиперкалиемии, это связано с повышенным выходом калия из клеток в случае определения калия в сыворотке крови, а не в плазме.

В качестве антикоагулянта при определении калия и натрия следует применять не натриевую, а литиевую соль гепарина, избегать гемолиза.

Методы определения натрия и калия: концентрацию натрия и калия измеряют сходными способами: методом пламенной атомно-эмиссионной спектроскопии (ПАЭС), потенциометрически при помощи ионоселективных электродов (ИСЭ), атомно-абсорбционной спектрометрией.

Вопросы для подготовки:

1.Баланс калия.

2. Роль ионов калия в мышечном сокращении, поддержании функций сердечно-сосудистой системы, почек.

1. Гипер- и гипокалиемия, клинические проявления, диагностика.
2. Метаболизм калия.
3. Регуляция обмена калия.

Вопросы и тесты для контроля знаний

1. Биоусвояемость калия составляет:
   1. 90-95%
   2. 55-58 %
   3. 17-20 %
2. Калий регулирует активность таких ферментов как:
   1. К +-АТФ-аза
   2. ацетилкиназа
   3. пируватфосфокиназа
   4. А, В, С
3. Клинические симптомы гиперкалиемии:
   1. а) Аритмия, желудочный ритм
   2. б) Мерцание желудочков
   3. в) Рвота, понос
   4. г) Остановка сердца в диастоле
4. Какой раствор следует применить для внутривенного введения при дефиците калия:
   1. а) 1% раствор KCl
   2. б) 7.5% раствор KCl
   3. в) 40 мл 7.5% раствора KCl, растворенных в 0.5-1 л 10% раствора глюкозы с
   4. добавлением 12.5 или 25 ед. инсулина соответственно
   5. г)10% раствор KCl
5. Уровень калия в крови в норме (в ммоль/л):
   1. а) 2.50 ммоль/л
   2. б) 3.30 ммоль/л
   3. в)4.50 ммоль/л
   4. г) 6.55 ммоль/л
6. Примерная суточная потребность взрослого человека в калии составляет:

а) 20 ммоль/л/м б) 40-50 ммоль/л/м в) 50-70 ммоль/л/м

г) 70-80 ммоль/л/м д) 80-100 ммоль/л/м

1. Гипокалиемией считают стойкое снижение сывороточной концентрации калия менее:

3,5 ммоль/л 4,3 ммоль/л 2,7 ммоль/л

Причины гипокалиемии: ацидоз; гастроинтерстициальные потери;

почечные потери; прием тиазидных диуретиков; алкалоз.

1. Причины гиперкалиемии:

дыхательная недостаточность; почечная недостаточность;

дефицит минералкортикоидов; алкалоз; ацидоз.

1. Основными клиническими симптомами дефицита калия являются:

а) Астенизация б) Мышечная слабость в) Дыхательные нарушения

г) Уплощение зубца Т и удлинение интервала QT

**2.6 Практическое занятие № 6 Кальций, гипер- и гипокальциемия у детей и взрослых.**

Общее количество кальция составляет 2% от массы тела. Кальций - основной внутриклеточный электролит. В организме более 90% кальция фиксируется костной тканью; 10% в сыворотке и межклеточной жидкости, из них 40% - циркулирует в комплексе с белками, 9% в виде солей (фосфаты, цитрат), оставшийся 51% присутствуют в ионизированной форме Са2+ и поэтому способны диффундировать в межклеточную жидкость.

Суточная потребность в кальции - 20-37,5 ммоль/л (0,8-1,5 г), у беременных и кормящих женщин потребность в кальции в 2 раза выше, у грудных детей – 0,6 г / сутки, дети в возрасте от 1 года и старше – до 1 г в сутки.

Источниками кальция служит растительная и животная пища: сыр, творог, молоко, овощи. Всасывание протекает в тонком кишечнике, в 50 раз медленнее, чем всасывание натрия, процесс контролируется гормонами, под влиянием фосфора и витамина Д. Выводится через ЖКТ и почки.

Физиологическое действие кальция: необходимо отметить, что внутриклеточная концентрация ионов Са 2+ низкая. Большая часть кальция в клетке связана с растворимыми лигандами, клеточными мембранами или аккумулирована во внутриклеточных депо. Именно свободный кальций (Са2+) является регулятором внутриклеточных процессов. С наружной стороны плазматической мембраны содержание Са2+ в 2000 раз выше. Плазматическая мембрана клеток обладает низкой проницаемостью для Са2+ ; экскреция Са2+ из клетки – это энергозависимый процесс. Благодаря низкой концентрации Са2+ в цитоплазме клеток и высокому градиенту концентрации по обе стороны плазматической мембраны этот ион имеет важное значение в регуляции жизнедеятельности клеток. Физиологически действие кальция связано с регуляцией проницаемости клеточных мембран: при низкой концентрации Са2+ в экстрацеллюлярной жидкости проницаемость мембран клеток увеличивается, приводя к повышению возбудимости клеток в центральной и периферической нервной системе. В противоположность этому при высокой концентрации Са2+ проницаемость клеточных мембран уменьшается со снижением рефлекторной активности, изменениями ЭКГ и возникновением болей в животе, миопатий и потерей аппетита. Изменение проводимости кальциевых каналов мембраны и внутриклеточного содержания Са2+ изменяет функционирование многих систем, включая процессы клеточного деления.

В норме общее содержание кальция в сыворотке крови здорового человека составляет 2,2-2,6 ммоль/л. Содержание белково-связанного кальция в сыворотке крови – 0,9 ммоль/л, ионизированного – 1,25 ммоль/л, неионизированного – 0,35 ммоль/л. У новорожденных (после 4-го дня жизни) – 1,75-3,2 ммоль/л; у недоношенных нижний предел кальция составляет 1,25 ммоль/л. Определение ионов Са2+ в сыворотке крови дает более ценную диагностическую информацию, чем определение общего уровня кальция.

Клиническое значение определения кальция: необходимо отметить, что уровень кальция в сыворотке крови изменяется при дисфункции паращитовидных и щитовидной желез, новообразованиях различной локализации, особенно при метастазировании в кости, а также почечной недостаточности. Вторичное вовлечение кальция в патологический процесс происходит при почечной недостаточности, патологии ЖКТ.

Терапевтические процедуры (гемотрансфузия, экстракорпоральные методы лечения) способны изменить обмен кальция и концентрацию катиона в сыворотке крови. Выделяют идиопатическую гиперкальциемию у грудных детей (уровень кальция 3,0-4,25 ммоль/л). При рахите уровень кальция имеет нормальные значения, либо незначительно снижается. Опасную для жизни гиперкальциемию отмечают при уровне кальция в сыворотке крови выше 15 мг% (3,75 ммоль/л). Основными клиническими симптомами выраженной гиперкальциемии являются стойкий запор, рвота, полиурия, сонливость и кома.

Гиперкальциемия отмечается при язвенной болезни, панкреатите, что связано с нарушением метаболизма кальция (в первую неделю острого панкреатита возможно развитие гипокальциемии, которая позже может смениться гиперкальциемией), интоксикации витамином D, гиперпаратиреозе (в 86%), а также при других эндокринных нарушениях (тиреотоксикоз, надпочечниковая недостаточность, акромегалия, секреция ПТГ клетками опухолей разных органов).

Также, гиперкальциемию выявляют в пожилом возрасте, основная причина - новообразование с метастазами в кости. В большинстве случаев при гиперкальциемии обнаруживается нормальное содержание в сыворотке крови фосфора и хлоридов. Заболевания системы крови (множественная миелома, лимфома, острый лейкоз) часто сопровождаются гиперкальциемией. Стероидиндуцированную гиперкальциемию можно наблюдать при приёме андрогенов, эстрогенов и глюкокортикоидов.

Саркоидоз, туберкулёз, гистоплазмоз также сопровождаются гиперкальциемией. Гиперкальциемию отмечают в педиатрической практике, особенно в условиях недостаточного поступления с пищей витамина D. В этих ситуациях витаминотерапия способствует нормализации содержания в крови, как кальция, так и фосфора. Гипокальциемия (содержание кальция в сыворотке крови менее 2,2 ммоль/л) отмечается при энтеритах, панкреатитах, механической желтухе, гиповитаминозе витамине Д (клинически - рахит), гипопаратиреозе, нефрозах и нефритах, хронической почечной недостаточности (ХПН) (нарушение синтеза витамина Д в почках и повышении экскреции Са с мочой), а также при фосфат-диабете (из-за нарушения реабсорбции кальция в канальцах).

Методами определения кальция в сыворотке крови являются количественная преципитация кальция избытком анионов щавелевой, хлоранилиновой или нафтилгидроксаминовой кислоты, флюоресцентный метод, а также прямое спектрофотометрическое определение концентрации кальция в сыворотке и моче, которое основано на формировании окрашенных комплексов кальция и органических молекул. Наиболее часто используемый референсный метод точного определения кальция – атомная абсорбция.

Ошибки при определении кальция: клинические наблюдения показали, что при определении концентрации кальция необходимо учитывать состояние пациента в момент взятия крови. Гиперкальциемия, как артефакт, может возникать при взятии крови в условиях выраженного венозного стаза. Содержание Са2+ у человека в горизонтальном и вертикальном положении после небольшой физической активности отличается на 0,32 ммоль/л; поэтому кровь на определение кальция следует брать в условиях минимального венозного стаза. Содержание кальция в крови зависит также и от приёма пищи: после еды оно возрастает на 0,1 ммоль/л. Поскольку почти половина количества кальция сыворотки крови связана с альбумином, следует учитывать также вариации в содержании белка.

После взятия крови имеется несколько источников ошибок. Абсорбция Са2+ на стенках пластикового шприца, взаимодействие с СО2 воздуха, изменение температуры меняют соотношение свободного и ионизированного кальция. Также использование в отдельных видах вакутейнеров полистироловых шариков, геля акриламида также способствует абсорбции кальция, в результате чего получаются заниженные результаты.

Вопросы для подготовки:

1. Охарактеризуйте метаболизм кальция в организме.

2. Какие гормоны участвуют в регуляции кальциевого обмена?

3. Какой вид рецепции преобладает у гормонов, регулирующих кальциевый обмен?

4. Как происходит превращение витамина D в кальцитриол?

5. Перечислите симптомы, наблюдающиеся при гипо- и гиперкальциемии.

6. Что может быть причиной изменения концентрации кальция в крови?

7. Какие органы играют важную роль в метаболизме кальция?

Вопросы и тесты для контроля знаний

1. Клиническими признаками гипокальциемии являются:

а) Гиперрефлексия

б) Тетания

в) Спазмофилия

г) Боли в животе

1. Общее содержание кальция организме составляет:
2. 1,4% (1000 г на 70 кг массы тела)
3. 2,0% (1500 г на 70 кг массы тела)
4. 1,8% (1200 г на 70 кг массы тела)

3. Биоусвояемость кальция:

a) 25-40%

b) 35-55%

c) 55-95%

4. Регуляция обмена кальция находится под влиянием:

1. кальцитонина, кальциферолов (витамин D)
2. кальцитонина, кальциферолов (витамин D), витамина А
3. кальцитонина, кальциферолов (витамин D), печени

5. Выводится кальций из организма:

1. ЖКТ, почки
2. ЖКТ, кожу
3. ЖКТ, почки, кожу

**3 Методические указания к лабораторным работам**

**3.1 Лабораторная работа № 1 Фильтрационная, реабсорбционная функции почек. Определение содержания мочевины, креатинина и мочевой кислоты.**

Методы определения мочевины

Мочевина представляет собой диамид угольной кислоты, образующийся в печени при обезвреживании аммиака. Молекулярная масса ее 60 дальтон. Из них 28 дальтон приходится на долю двух атомов азота, входящих в состав молекулы мочевины. Следовательно, при необходимости сопоставления концентрации остаточного азота с содержанием азота мочевины концентрацию последней следует разделить на 2,14 (60:28). Только при получении таких соизмеримых величин возможно нахождение процента содержания азота мочевины от всего остаточного азота, что имеет очень большое значение для дифференциации по-ражений печени и почек.

Основные группы методов определения содержания мочевины подразде-ляют на: 1) газометрические или гипобромитные; 2) ксантгидроловые; 3) диа-цетилмонооксимные; 4) гипохлоритные; 5) уреазные; 6) прочие - с р-диметиламинобензальдегидом (реактив Эрлиха), изонитропропиофеноном, ди-метилгликоксимом. Известны также полуколичественные, ориентировочные методы установления концентрации мочевины с помощью реактивной бумаги. Объемно-гипобромитный метод А. П. Бородина и его модификации основаны на разложении мочевины гипобромитом натрия в щелочной среде - СО(NH2)2 + 3NaBrO = N2+CO2 + 3NaBr + 2Н2О. Выделяющуюся углекислоту поглощает раствор, свободным остается только азот, объем которого измеряют. Метод не-специфичен, так как гипобромит реагирует не только с мочевиной, но и с дру-гими компонентами остаточного азота, содержащими аминогруппы. На опреде-ление требуется большое количество крови и брома (весьма токсичного реакти-ва), иногда не удается точно замерить объем выделившегося газа из-за прили-пания пузырьков к стенкам аппарата. Сам же стеклянный прибор, в котором производят определение, часто выходит из строя вследствие хрупкости.

Известно много веществ, дающих с мочевиной окрашенные соединения. На этом принципе основан ряд колориметрических методов. Так, гетероцикли-ческий спирт ксантгидрол вступает в соединение с мочевиной, образуя осадок - диксантилмочевину. В дальнейшем мочевину можно определять различными способами: гравиметрическим (высушиванием и взвешиванием), нефелометри-ческим, колориметрическим (осадок растворяют в серной кислоте, в результате чего возникает цветная реакция), титрометрическим.

Ксантгидроловые методы более точны, чем гипобромитные, однако в клинико-диагностических лабораториях их применяют редко из-за большой трудоемкости выполнения и дефицитности реактивов.

Наиболее распространены колориметрические методы, основанные на ре-акции Фирона - взаимодействии мочевины и диацетилмонооксима с образова-нием окрашенных продуктов. Для повышения чувствительности и стабилизации цвета реактива предложен ряд модификаций метода с использованием разных веществ: триптофана и нитритов, фенилантраниловой кислоты, антипирина, персульфата калия, тиосемикарбазида и солей железа. Последняя модификация положена в основу определения мочевины при помощи диагностических наборов реактивов, выпускаемых фирмой «Лахема» (Чехия).

Преимуществом метода с использованием реакции Фирона является его простота: на проведение анализа требуется 15-20 мин. Причем исследование можно проводить и в капиллярной крови.

Фенолгипохлоритный метод Б. А. Рашкована, состоящий в появлении ха-рактерной окраски при взаимодействии мочевины с гипохлоритом натрия и фе-нолом, не нашел широкого распространения в клинико-диагностических лабо-раториях из-за трудности приготовления фенолгипохлоритного реактива и ряда других причин (различного оттенка окраски опытных и контрольных проб, ча-стого появления мути при добавлении НС1).

Наиболее точными и специфичными способами определения концентра-ции мочевины являются ферментативные уреазные методы.

В качестве препарата уреазы можно использовать тыквенные или арбуз-ные семечки, соевую муку, однако лучше всего применять для этой цели кри-сталлический фермент, выпускаемый отечественной промышленностью. Этот реактив отличается сравнительно большой стойкостью.

Заслуживает внимания быстрое ориентировочное (полуколичественное) определение концентрации мочевины с помощью реактивной бумаги. В основу его положено действие уреазы на мочевину. Еще в период существования Со-ветского Союза завод «Реагент» освоил выпуск специальной индикаторной (ре-активной) бумаги под названием «Уреатест». Аналогичные диагностические тесты производят и за рубежом.

Кондуктометрические методы и способы, состоящие в применении ион-селективных электродов, быстры, но требуют специального оборудования.

Из всего многообразия методов изучения уровня мочевины в биологиче-ских жидкостях в качестве унифицированных утверждены: 1) экспресс-метод - определение содержания мочевины с использованием реактивной бумаги «Уре-атест»; 2) диацетилмонооксимный - простой, чувствительный, достаточно спе-цифичный способ (им также определяют мочевину с помощью набора реактивов чешской фирмы «Лахема»), позволяет в течение короткого периода времени проводить исследование в капиллярной крови и других биологических жид-костях; 3) ферментативный (как наиболее специфичный)-с применением кри-сталлического препарата уреазы.

При невозможности по какой-либо причине наладить в лаборатории один из перечисленных унифицированных методов предлагается освоить простой уреазный способ установления концентрации мочевины с использованием фермента, содержащегося в семечках арбуза или тыквы. Будучи весьма специ-фичным и простым, он может быть поставлен в любой клинико-диагностической лаборатории. Определение основано на способности уреазы гидролизовать мочевину с образованием аммиака, по количеству которого и судят о концентрации исследуемого продукта в биологической жидкости. Для установления содержания аммиака чаще всего применяют реактивы Несслера и Бертлота.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Бе-ларусь, 1982. 367 с.

Определение мочевины сыворотке крови экспресс-методом с приме-нением реактивной бумаги «Уреатест»

Исследование проводят согласно прилагаемой к наборам индикаторной бумаги инструкции, из которой следует, что «Уреатест» предназначен для быстрого полуколичественного определения мочевины в сыворотке крови.

Содержащиеся в упаковке полоски хроматографической бумаги размером 120х10 мм пропитаны растворами фермента и индикатора. Зоны их нанесения разделены красной парафиновой полоской. При проведении анализа бумажку следует держать за свободный конец. В комплекте находится 20 штук реактив-ных бумажек, калибровочный график и инструкция.

Принцип. Метод основан па способности уреазы расщеплять мочевину, приводящую к выделению аммиака, который окрашивает индикатор в голубой цвет. Высота в мм окрашенной зоны пропорциональна концентрации мочевины. Последнюю рассчитывают по калибровочному графику.

С помощью реактивной бумаги можно установить уровень мочевины в сыворотке крови в пределах от 20 до 250 мг/100 мл или соответственно от 3,33 до 41,62 ммоль/л.

Ход определения. Сыворотку крови разводят дистиллированной водой в отношении 1:1. На пропитанный ферментом конец бумажки в 3 мм от красной парафиновой полосы наносят специальной мерной пипеткой 0,03 мл приготов-ленной сыворотки крови. Бумажку быстро помещают в чистую сухую пробирку, герметически закрывают ее пробкой и оставляют на 20 мин при +37 °С или на 30 мин при +20°C в термостате.

Затем измеряют высоту индикаторной зоны, окрашенной в голубой цвет. По приложенному графику находят концентрацию мочевины.

В случае использования неразбавленной сыворотки или цельной крови результат делят на 2.

Примечание. Комплект «Уреатест» следует хранить в сухом, темном, прохладном месте. Срок годности - 8 мес. со дня выпуска.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Бе-ларусь, 1982. 367 с.

Определение мочевины в сыворотке крови и в моче по цветной реакции с диацетилмонооксимом

Принцип. Мочевина образует с диацетилмонооксимом в присутствии тиосемикарбазида и солей железа в кислой среде окрашенные вещества, интен-сивность окраски которых пропорциональна содержанию мочевины в сыворотке крови и в моче.

Реактивы. 1. Раствор трихлоруксусной кислоты -10 г/100 мл.

2. Водный раствор диацетилмонооксима - 2,5 г/100 мл. Реактив стоек.

3. Водный раствор (0,25 г/100 мл) тиосемикарбазида или солянокислого тиосемикарбазида (0,32 г/100 мл). Оба реактива стабильны неограниченно дол-гое время, если хранить их в темной посуде при комнатной температуре.

4. Раствор хлорного железа. 5 г хлорного железа растворяют в 100 мл ди-стиллированной воды и подкисляют 1 мл концентрированной серной кислоты. Приготовленный таким образом основной раствор используют для получения рабочего раствора хлорного железа путем добавления к 1 мл первого дистилли-рованной воды до объема 100 мл и последующего приливания 8 мл концентри-рованной серной кислоты и 1 мл раствора ортофосфорной кислоты (85 г/100 мл). Раствор хранят в темной посуде и используют в течение 2 недель.

5. Цветной реактив. К 30 мл рабочего раствора хлорного железа добавля-ют 20 мл дистиллированной воды, 1 мл раствора диацетилмонооксима (реактив 2) и 0,25 мл раствора тиосемикарбазида (реактив 3). Цветной реагент готовят каждый раз непосредственно перед употреблением.

6. Стандартный раствор мочевины. 1,0 г мочевины растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Из этого основного раствора готовят рабочий разве-дением основного в 10 раз.

Согласно приказу МЗ СССР об унификации лабораторных методов ис-следования (1972, №290, с. 69-70), рекомендуется сразу приготовлять рабочий раствор мочевины, используя вместо воды раствор бензойной кислоты концен-трации 0,2 г/100 мл (0,2 г кристаллической бензойной кислоты растворяют в 100 мл дистиллированной воды при интенсивном перемешивании и нагревании содержимого склянки на водяной бане). Стандарт на растворе бензойной кис-лоты более стабилен, чем водный.

При работе оба раствора должны давать небольшие колебания экстинк-ции. В противном случае их необходимо заменить. 1 мл стандартного раствора содержит 1 мг мочевины (1 г/л, или 16,65 ммоль/л).

Ход определения концентрации мочевины в сыворотке крови. В центри-фужную пробирку вносят 0,8 мл дистиллированной воды, 0,2 мл сыворотки и 1,0 мл раствора трихлоруксусной кислоты, содержимое ее смешивают. Через 15-20 мин смесь центрифугируют.

В чистую пробирку вносят 0,5 мл надосадочной жидкости и 5 мл цветного реактива (5). Пробирку выдерживают в кипящей водяной бане 20 мин, затем охлаждают в течение 2-3 мин под водопроводной водой. Измерение экстинкции пробы проводят на фотоэлектроколориметре при длине волны 500-560 нм (зе-леный светофильтр) в кювете с шириной слоя 10 мм.

Учитывают оптическую плотность контрольной пробы, которую ставят так же, как опытную, но вместо надосадочной жидкости берут 0,5 мл дистилли-рованной воды.Стандартную пробу проводят, как опытную, с той лишь разни-цей, что вместо сыворотки в ней используют 0,2 мл стандартного раствора мо-чевины.

Допустим и второй вариант постановки стандартной пробы, при котором в пробирку вносят 0,05 мл рабочего стандартного раствора, 0,25 мл раствора трихлоруксусной кислоты, 0,2 мл дистиллированной воды и сразу 5,0 мл цвет-ного реактива. Этот способ, несмотря на большую простоту, отличается не-сколько меньшей точностью из-за трудности взятия пипеткой ровно 0,05 мл жидкости.

В обоих случаях расчет производят по формуле: 

где х - концентрация мочевины (ммоль/л); Еоп. - экстинкция опытной пробы; Ест.- экстинкция стандартной пробы; 16,65-концентрация мочевины (ммоль/л) в стандартном растворе.

Примечания: 1. Ввиду неустойчивости получаемой окраски измерение экстинкции следует проводить не позже чем через 15 мин после охлаждения проб.

2. Из-за неустойчивости окрашенного комплекса мочевины с диацетилмонооксимом и зависимости окраски от условий нагревания калибровочный график строить не рекомендуется.

3. При содержании мочевины в сыворотке крови выше 16,65 ммоль/л сыворотку раз-водят физиологическим раствором, а результат умножают на коэффициент разведения.

4. При определении содержания мочевины в моче, начиная с величины экстинкции 0,13-0,15, следует увеличивать разведение мочи.

5. Пересчет показателей мочевины на содержание азота в мочевине осуществляют путем умножения на фактор 0,466 (или делением на 2,14).

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Бе-ларусь, 1982. 367 с.

Определение мочевины в сыворотке крови уреазным методом по ре-акции с фенолгипохлоритом

Принцип. Мочевина под действием уреазы разлагается на углекислый газ и аммиак, содержание которого устанавливают колориметрически по образова-нию окрашенных продуктов с гипохлоритом и фенолом.

Реактивы. 1. Раствор ЭДТА - динатриевой соли этилендиаминтетрауксус-ной кислоты (трилон Б, селектон, хелатон, комплексон III, версен). 1 г ЭДТА растворяют в 90 мл дистиллированной воды, доводят рН до 6,0, корригируя кислую реакцию среды 5 н раствором едкого натра, и приливают воду до объема 100 мл. Этот реактив используют для приготовления раствора уреазы.

2. Раствор уреазы с рН 6,0. 0,02 г ферментативного препарата уреазы вно-сят в 50 мл раствора ЭДТА, проверяют и в случае необходимости устанавлива-ют нужное значение рН.

Отечественная уреаза имеет активность около 870 ед. Sumner на 1 г белка. Для реакции пригодна уреаза с активностью 800- 1000 ед. Sumner на 1 г белка. Препарат уреазы хранят в холодильнике в плотно закрытой упаковке. При со-блюдении этих условий фермент стабилен в течение месяца.

3. Раствор фенола и нитропруссида натрия (цветной реактив). 0,25 г нит-ропруссида натрия (ч.д.а) растворяют в 500 мл дистиллированной воды, добав-ляют 50 мл или 54 г фенола (ч.д.а) и доливают дистиллированной водой до 2 л. Раствор стабилен в течение месяца при хранении его в холодильнике в посуде из темного стекла.

4. Основной раствор гипохлорита натрия (NaOCl). 100 г хлорной извести (СаОС12) размешивают в течение 15 мин со 170 мл дистиллированной воды, после чего прибавляют, непрерывно помешивая, раствор, состоящий из 170 мл дистиллированной воды и 70 г углекислого натрия (Na2CO3). Масса сначала гу-стеет, затем разжижается, ее оставляют стоять до следующего дня. Надосадоч-ную жидкость (гипохлорит натрия) сливают и фильтруют через промытый ди-стиллированной водой фильтр. Хранят в холодильнике в посуде из темного стекла. Срок годности раствора – 1-2 мес.

Для определения активности хлора 1 мл основного раствора гипохлорита натрия смешивают с 100 мл дистиллированной воды. К 50 мл этого раствора добавляют 5,0 мл свежеприготовленного раствора йодистого калия (реактив 8) и 10 мл раствора соляной кислоты (реактив 7). Титруют раствором тиосульфата натрия (реактив 5). Как только раствор приобретет слабо-желтую окраску, до-бавляют 10 капель 1 г/100 мл раствора крахмала и продолжают титрование до обесцвечивания.

Концентрацию активного хлора в г на 100 мл раствора гипохлорита натрия рассчитывают по формуле:

а \* 0,709,

где а - количество мл тиосульфата натрия, пошедших на титрование; 0,709 - ко-эффициент пересчета 1,0 мл раствора тиосульфата натрия в значения концен-трации (г/100 мл) хлора.

Таким образом, по содержанию хлора судят о качестве приготовленного раствора гипохлорита натрия.

После установления концентрации активного хлора основной раствор ги-похлорита разводят так, чтобы концентрация хлора в нем равнялась 0,5 г/100 мл. Этот раствор смешивают с равным объемом 5 и раствора едкого натра и ис-пользуют для реакции. Активность хлора проверяют не реже 1 раза в две неде-ли.

5. 0,1 и раствор тиосульфата натрия. 25 г кристаллического тиосульфата натрия (Na2S2O6•5Н2О) растворяют в 1 л дистиллированной воды.

6. 5 н раствор едкого натра.

7. 6 н раствор соляной кислоты.

8. Раствор йодистого калия-5 г/100 мл.

9. Стандартный (калибровочный) раствор мочевины - 6,66 ммоль/л. 40 мг высушенной до постоянного веса мочевины растворяют в мерной колбе в 100 мл реактива 10. Стандартный раствор можно готовить и на дистиллированной воде, но от этого он будет менее стабилен. 1 мл его содержит 0,4 мг мочевины. Раствор хранят в холодильнике.

10. Раствор бензойной кислоты-0,2 г/100 мл. 0,2 г кристаллической бен-зойной кислоты вносят в 100 мл дистиллированной воды, интенсивно переме-шивают и нагревают смесь до полного растворения кристаллов.

Ход определения. Для приготовления опытной пробы 0,5 мл раствора уреазы вносят в пробирку с притертой пробкой, добавляют 0,02 мл сыворотки. Пробирку закрывают пробкой и смесь инкубируют 15 мин при + 37 °С. После инкубации приливают 10 мл цветного реактива и 1 мл раствора гипохлорита натрия. Содержимое пробирки перемешивают и оставляют стоять 20 мин при +37 °С. Через 10 мин измеряют экстинкцию на ФЭКе в кювете с шириной слоя 10 мм, используя зеленый светофильтр с максимумом пропускания 500-560 нм. При этом учитывают значение оптической плотности контрольной пробы.

Контрольную пробу ставят так же, как опытную, но вместо сыворотки берут дистиллированную воду.

Стандартную пробу обрабатывают как опытную, но вместо сыворотки используют калибровочный раствор мочевины. Измерение экстинкции осу-ществляют при условиях, аналогичных таковым для опытной пробы. В расчет принимают значения оптической плотности опытной и стандартной проб за вычетом экстинкции контрольной пробы.

Расчет ведут по формуле:

Концентрация мочевины (ммоль/л) = Е1/Е2 \* 6,66,

где Е1 - экстинкция опытной пробы; Е2 - экстинкция стандартной пробы; 6,66 - концентрация стандартного раствора мочевины (ммоль/л).

В норме содержание мочевины в сыворотке крови составляет 2,50-8,33 ммоль/л.

Для пересчета результатов на азот мочевины показатель ее концентрации в ммоль/л делят на 2,14.

Примечания: 1. Построение калибровочного графика не рекомендуется, так как ин-тенсивность окраски проб зависит от условий опыта. Поэтому правильнее обрабатывать стандартные пробы одновременно с опытными и вести расчет результатов по формуле.

2. Серия проб не должна превышать 10.

3. Если сыворотка мутная или окрашенная, то проводят дополнительную контроль-ную пробу - в смесь добавляют сыворотку и все реактивы без инкубации Показатель экс-тинкции этой контрольной пробы вычитают из значения оптической плотности опытной.

4. Окраска проб стабильна в течение нескольких часов.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Бе-ларусь, 1982. 367 с.

Определение мочевины крови уреазным методом по реакции с реактивом Несслера

Принцип метода основан на разложении мочевины крови или сыворотки ферментом уреазой с последующим измерением количества образующегося аммиака колориметрическим способом (с использованием реактива Несслера).

Реактивы. 1. Препарат уреазы: а) очищают 3-4 семечка арбуза, извлечен-ные зерна растирают в ступке, сначала в 1,0 мл, затем в 10,0 мл воды. Получен-ную эмульсию фильтруют. В семечках ферментативная активность сохраняется более 2 лет. Вместо арбузных семечек можно брать и тыквенные; б) сухая соевая мука – 10-12 мг на пробу.

2. Раствор кристаллического сульфата цинка - 7,5 г/100 мл.

3. Раствор едкого натра - 1,5 г/100 мл.

Проверка титров растворов 2 и 3: на титрование 10 мл раствора сульфата цинка в присутствии фенолфталеина (в качестве индикатора) должно пойти 10,8-11,2 мл раствора NaOH.

4. Раствор сегнетовой соли (KNaC4H4O6 - виннокислый К, Na) - 0,2 г/100 мл.

5. Реактив Несслера.

6. Стандартный раствор мочевины с содержанием 30 мг мочевины в 100 мл воды -5 ммоль/л.

Ход определения. В две пробирки - опытную и стандартную - вносят по 1,5 мл дистиллированной воды. Затем в опытную добавляют 0,1 мл крови или сыворотки, а в стандартную -0,1 мл стандартного раствора мочевины, после че-го в каждую из пробирок приливают по 0,5 мл препарата уреазы или всыпают по 10-12 мг сухой соевой муки. Содержимое пробирок перемешивают, плотно закрывают корковыми пробками, выдерживают 20 мин в водяной бане (или в термостате) при +37°С, охлаждают водой и добавляют в каждую пробирку по 0,2 мл раствора сульфата цинка (ZnSO4) и по 0,2 мл раствора едкого натра (NaOH). После тщательного перемешивания производят центрифугирование (до получения прозрачной надосадочной жидкости), из каждой пробы отбирают по 1,25 мл центрифугата, который переносят в две другие чистые пробирки. В них приливают по 2,25 мл раствора сегнетовой соли и по 0,5 мл реактива Несслера. Содержимое пробирок перемешивают и колориметрируют на ФЭКе с синим светофильтром в кювете с шириной слоя 5 мм, используя в качестве кон-трольного раствора воду (1) или специально подготовленную контрольную пробу (2).

Последнюю готовят путем добавления к 1,25 мл дистиллированной воды 2,25 мл раствора сегнетовой соли и 0,5 мл реактива Несслера.

Расчет ведут решением пропорций 1 и 2:

(Еоп.- Ек.) - х ммоль/л, (Ес.- Ек.) — 5 ммоль/л, тогда х = (Еоп.—Ек.) / (Ес.— Ек.)\*5 ммоль/л = а ммоль/л (1).

Еоп.—х ммоль/л. Ес.—5 ммоль/л, тогда х—Еоп./Ес.\*5 ммоль/л = а ммоль/л (2),

где Еоп, Ек и Ес.— экстинкция опытной, контрольной и стандартной проб со-ответственно.

В случае расчета по формуле 2 используют значение оптической плотно-сти опытной и стандартных проб за вычетом экстинкции контрольной пробы.

При трактовке результатов анализа следует исходить из того, что диета с низким содержанием белка может уменьшить концентрацию мочевины в крови, и наоборот, при избыточном питании азотистыми продуктами уровень мочеви-ны обычно колеблется около верхней границы нормы. Диета, бедная ионами хлора, также нередко приводит к повышению концентрации мочевины. Физио-логическое состояние организма, связанное с беременностью, часто сопровож-дается уменьшением концентрации мочевины в крови.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Бе-ларусь, 1982. 367 с.

Определение мочевой кислоты в сыворотке крови

Цели практической работы:

• закрепить знания о превращениях нуклеопротеидов в организме;

• научиться исследовать содержание мочевой кислоты в сыворотке крови.

Задания для самостоятельной работы:

1. Перепишите в тетрадь принцип и методику проведения практической работы.

2. Оборудуйте рабочее место для практической работы.

3. Выполните практическую работу.

4. Сделайте необходимые расчеты.

5. Заполните бланк анализа. Оцените полученные результаты.

6. Сделайте вывод по работе и рисунки.

7. Ответьте на дополнительные вопросы.

Принцип:

Мочевая кислота восстанавливает фосфорно-вольфрамовый реактив с образованием соединения голубого цвета, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации мочевой кислоты в исследуемой пробе.

|  |  |
| --- | --- |
| Реактивы:  1. Вода дистиллированная.  2. Серная кислота конц.  3. Натрий фольфрамовокислый.  4. Карбонат натрия.  5. Фосфорно-вольфрамовый реактив.  6. Калибровочный раствор мочевой кислоты.  7. Сыворотка крови. | Оборудование:  1. ФЭК с кюветой 1 см.  2. Центрифуга.  3. Центрифужные пробирки.  4. Штатив с пробирками.  5. Пипетки на 1, 2, 5 мл.  6. Фильтровальная бумага.  7. Стеклянная палочка. |

Ход определения:

• Проведите исследование мочевой кислоты в сыворотке крови в соответствии с таблицей.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Реактивы.** | **Опыт, мл.** | **Калибровка, мл.** | **Контроль, мл.** |
| Вода дистиллированная | 4,0 | - | - |
| Сыворотка крови. | 0,50 | - | - |
| Серная кислота. | 0,25 | - | - |
| Смесь перемешивают стеклянной палочкой и добавляют. | | | |
| Натрий вольфрамовокислый. | 0,25 |  |  |
| Смесь тщательно перемешивают и через 5 минут центрифугируют 10 минут при 3000 об/мин. | | | |
| Надосадочная жидкость. | 2,00 | - | - |
| Калибровочный раствор. | - | 2,00 | - |
| Вода дистиллированная. | - | - | 2,00 |
| Карбонат натрия. | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| Фосфорновольфрамовый реактив. | 0,60 | 0,60 | 0,60 |

• Смеси тщательно перемешать стеклянной палочкой.

• Пробирки оставить на 30 минут.

• Определить экстинцию опытной (Ео) и калибровочной (Ек) проб против контроля.

Расчет результатов проводим по формуле:

Скреат = Ео / Ек \* 300 (мкмоль/л).

Норма в плазме крови:

- у мужчин 0,24-0,5 ммоль/л;

- у женщин 0,16-0,44 ммоль/л.

Клинико-диагностическое значение определения мочевой кислоты.

Мочевая кислота - главный продукт распада основного компонента нуклеиновых кислот пуриновых оснований. Поскольку она не используется далее в обменных процессах, то выделяется почками с мочой.

Исследование содержания мочевой кислоты представляет особый интерес для диагностики подагры, т.к. это заболевание тесно связано с нарушением обмена пуриновых оснований. Оно характеризуется отложением солей мочевой кислоты в суставах и других тканях, а также увеличение мочевой кислоты в крови.

Гиперурикемия - повышение уровня мочевой кислоты в крови - наблюдается при:

• заболеваниях, которые сопровождаются распадом клеточных элементов (лейкозах, эритроцитозах, злокачественных новообразованиях, инфаркте миокарда, голодании);

• нарушении выделительной функции почек (гломерулонефрит);

• подагре;

• употребление пищи богатой пуриновыми основаниями и жирами.

Гипоурекемия - понижение уровня мочевой кислоты в крови - отмечается при лечении препаратами пиперазинового ряда, иногда при гепатите, анемиях.

Урикозурия - увеличение уровня мочевой кислоты в моче обнаруживается в 25-30 % случаев подагры, некоторых наследственных заболеваниях (синдром Леша-Найхана) и нарушениях накопления гликогена.

Уменьшение уровня мочевой кислоты в моче обычно отражает развитие почечной недостаточности, прием салицилатов в дозе 2-3 г в сутки.

Ответьте на вопросы:

1. Напишите схематично процесс переваривания и распада нуклеопротеидов.

2. Нарисуйте схему образования нуклеопротеидов в клетках.

3. В чем заключается основное клиническое значение мочевой кислоты?

4. Расскажите о причинах, течении, диагностике, лечении и профилактике подагры.

5. О какой патологии может идти речь, если уровень мочевой кислоты в крови повышен, а в моче понижен? Почему вы так считаете? К какому виду азотемии можно отнести данный случай?

**3.2 Лабораторная работа № 2 Определение содержания белка в моче различными методами**

Небольшое количество белка в суточной моче обнаруживается и у вполне здоровых лиц, однако такие небольшие концентрации не выявляют в разовых порциях используемыми в настоящее время методами. Приблизительно 70% белков мочи здорового человека приходится на долю уромукоида — белка, являющегося продуктом почечной ткани; таким образом, доля гломерулярного белка в моче здоровых людей является ничтожно малой и протеинурия в норме составляет 50—150 мг/сут, причем большинство белков мочи идентично сывороточным.

Принято различать следующие формы протеинурии в зависимости от места возникновения: преренальную, связанную с усиленным распадом белка тканей, выраженным гемолизом; ренальную, обусловленную патологией почек, которая может быть разделена на клубочковую и канальцевую; постренальную, связанную с патологией мочевыводящих путей и чаще всего обусловленную воспалительной экссудацией.

В зависимости от длительности существования выделяют постоянную протеинурию, существующую в течение многих недель и даже лет, и преходящую, появляющуюся периодически, иногда даже при отсутствии патологии почек, например при лихорадке и выраженной интоксикации. Целесообразно различать вариабельность протеинурии: при суточной потере белка до 1 г — умеренную, от 1 до 3 г — среднюю и более 3 г — выраженную.

Обнаружение в моче белков с относительно большой молекулярной массой свидетельствует об отсутствии избирательности почечного фильтра и выраженном его поражении. В этих случаях говорят о низкой селективности протеинурии. Поэтому в настоящее время широкое распространение получило определение белковых фракций мочи. Наиболее точны методы электрофореза в крахмальном и полиакриламидном геле.

По результатам, полученным этими методами, можно судить о селективности протеинурии.

Большинство качественных и количественных методов определения белка в моче основаны на его коагуляции в объеме мочи или на границе сред (мочи и кислоты); если есть способ измерить интенсивность коагуляции, то проба становится количественной.

Унифицированная проба с сульфосалициловой кислотой:

Необходимый реактив:

20%-ный раствор сульфосалициловой кислоты.

Ход исследования:

В 2 пробирки наливают по 3 мл профильтрованной мочи. В опытную пробирку прибавляют 6—8 капель реактива. На темном фоне сравнивают контрольную пробирку с опытной. Помутнение в опытной пробирке указывает на наличие белка, пробу считают положительной.

Если реакция мочи щелочная, то перед исследованием ее подкисляют 2—3 каплями 10%-ного раствора уксусной кислоты.

Унифицированный метод Брандберга—Робертса—Стольникова:

В основу метода положена кольцевая проба Геллера, заключающаяся в том, что на границе азотной кислоты и мочи при наличии белка происходит его коагуляция и появляется белое кольцо.

Необходимый реактив:

30%-ный раствор азотной кислоты (относительная плотность 1,2) или реактив Ларионовой. Приготовление реактива Ларионовой: 20—30 г хлорида натрия растворяют при нагревании в 100 мл дистиллированной воды, дают остыть, фильтруют. К 99 мл фильтрата приливают 1 мл концентрированной азотной кислоты.

Ход исследования:

В пробирку наливают 1—2 мл азотной кислоты (или реактива Ларионовой) и осторожно, по стенке пробирки, наслаивают такое же количество профильтрованной мочи. Появление тонкого белого кольца на границе двух жидкостей между 2 и 3-й минутой указывает на наличие белка в концентрации примерно 0,033 г/л. Если кольцо появляется раньше 2 мин после наслаивания, мочу следует развести водой и провести повторное наслаивание уже разведенной мочи. Степень разведения мочи подбирают в зависимости от вида кольца, т.е. его ширины, компактности и времени появления. При нитевидном кольце, появившемся ранее 2 мин, мочу разводят в 2 раза, при широком — в 4 раза, при компактном — в 8 раз и т.д. Концентрацию белка при этом вычисляют путем умножения 0,033 на степень разведения и выражают в граммах на 1 л (г/л).

Иногда белое кольцо получается при наличии больших количеств уратов. В отличие от белкового кольца уратное появляется немного выше границы между двумя жидкостями и растворяется при легком нагревании.

Количественное определение белка в моче по помутнению, образующемуся при добавлении сульфосалициловой кислоты:

Принцип метода:

Интенсивность помутнения при коагуляции белка сульфосалициловой кислотой пропорциональна его концентрации.

Необходимые реактивы:

1. 3%-ный раствор сульфосалициловой кислоты.

2. 0,9%-ный раствор хлорида натрия.

3. Стандартный раствор альбумина — 1%-ный раствор (1 мл раствора, содержащий 10 мг альбумина): 1 г лиофилизированного альбумина (из человеческой или бычьей сыворотки) растворяют в небольшом количестве 0,9%-ного раствора хлорида натрия в колбе вместимостью 100 мл, а затем доводят до метки тем же раствором. Реактив стабилизируют прибавлением 1 мл 5%-ного раствора азида натрия (NaN3). При хранении в холодильнике реактив годен в течение 2 месяцев.

Специальное оборудование — фотоэлектроколориметр.

Ход исследования:

В пробирку вносят 1,25 мл профильтрованной мочи, доливают до 5 мл 3%-ным раствором сульфосалициловой кислоты, перемешивают. Через 5 мин измеряют на фотоэлектроколориметре при длине волны 590—650 нм (оранжевый или красный светофильтр) против контроля в кювете длиной оптического пути 5 мм. Контролем служит пробирка, в которой к 1,25 мл профильтрованной мочи долили до 5 мл 0,9%-ный раствор хлорида натрия. Расчет ведут по калибровочному графику, для построения которого из стандартного раствора готовят разведения, как указано в таблице.

Из каждого полученного раствора берут 1,25 мл и обрабатывают, как опытные пробы.

Прямолинейная зависимость при построении калибровочного графика сохраняется до 1 г/л. При более высоких концентрациях пробу следует разводить и учитывать разведение при расчете.

Ложноположительные результаты могут быть получены при наличии в моче контрастных веществ, содержащих органический йод. Поэтому тест нельзя использовать у лиц, принимающих препараты йода; ложноположительный результат может быть также обусловлен приемом сульфаниламидных препаратов, больших доз пенициллина и при высоких концентрациях в моче мочевой кислоты.

Биуретовый метод:

Принцип метода:

Пептидные связи белка с солями меди в щелочной с образуют комплекс фиолетового цвета. Белки предварительно осаждают трихлоруксусной кислотой.

Необходимые реактивы:

1. 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты.

2. 20%-ный раствор меди (CuSO4∙5H2O).

3. 3%-ный раствор NaOH.

Ход исследования:

К 5 мл мочи, взятой из суточного количества, прибавляют 3 мл раствора трихлоруксусной кислоты, центрифугируют до постоянного объема осадка. Надосадочную жидкость отсасывают пипеткой, осадок затем растворяют в 5 мл раствора NaОН. К раствору добавляют 0,25 мл CuSO4, смесь перемешивают и центрифугируют. Надосадочную жидкость фотометрируют при длине волны 540 нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм против дистиллированной воды. Концентрацию белка рассчитывают по калибровочной кривой, при построении которой на оси ординат откладывают концентрацию белка (г/л), а на оси абсцисс — оптическую плотность в единицах экстинкции. По полученной концентрации рассчитывают суточную потерю белка с мочой.

С помощью индикаторной бумаги (полосок):

Белок может быть обнаружен с помощью индикаторной бумаги (полосок), которые выпускаются фирмами “Albuphan”, “Ames” (Англия), “Albustix”, “Boehringer” (Германия), “Comburtest” и др.

Принцип основан на феномене так называемой протеиновой ошибки некоторых кислотно-щелочных индикаторов. Индикаторная часть бумаги пропитана тетрабромфеноловым синим и цитратным буфером. При увлажнении бумаги буфер растворяется и обеспечивает соответствующий рН для реакции индикатора.

При 3,0—3,5 аминогруппы белков реагируют с индикатором и меняют его первоначально желтую окраску на зеленовато-синюю, после чего, сравнивая с цветной шкалой, можно ориентировочно оценить концентрацию белка в исследуемой моче. Основной предпосылкой правильной работы индикаторных полосок является обеспечение pH в диапазоне 3,0—3,5 для протекания реакции.

Если бумага находится в контакте с исследуемой мочой дольше экспозиции, указанной в инструкции, то цитратный буфер в ней растворяется, и тогда индикатор реагирует на истинный рН мочи, т.е. дает ложноположительную реакцию. В связи с тем, что емкость буфера ограничена, то даже при соблюдении методических указаний в пробах слишком щелочной мочи (pH > 6,5) получаются ложноположительные результаты, а в пробах слишком кислой мочи (рН < 3,0) — ложноотрицательные.

Число реагирующих аминогрупп в составе отдельных белков различно, поэтому альбумины реагируют в 2 раза интенсивнее, чем такое же количество γ-глобулинов (белок Бенс-Джонса, парапротеины), и гораздо интенсивнее, чем гликопротеиды. Однако при большом количестве слизи с высоким содержанием гликопротеидов (при воспалении мочевыводящих путей) оседающие на индикаторной полоске хлопья слизи могут давать ложноположительные результаты.

Чувствительность отдельных производственных серий индикаторной бумаги, равно как и отдельных видов бумаги, выпускаемых одной и той же фирмой, может быть различной, поэтому к количественной оценке белка этим методом следует относиться осторожно. Определение суточной потери белков с мочой при помощи индикаторной бумаги невозможно. Таким образом, индикаторная бумага уступает химическим пробам, в первую очередь пробе с сульфосалициловой кислотой, хотя и дает возможность быстрого исследования серии образцов.

Обнаружение в моче белка Бенс-Джонса:

Белок Бенс-Джонса может выделяться с мочой при миеломной болезни, макроглобулинемии Вальденстрема.

Исследование целесообразно проводить только при положительной пробе с сульфосалициловой кислотой. Индикаторная бумага для обнаружения белка Бенс-Джонса непригодна.

Принцип:

Основан на реакции термопреципитации. Методы, с помощью которых оценивают растворение белка Бенс-Джонса при температуре 100 °С или повторное осаждение при последующем охлаждении, ненадежны, так как далеко не все белковые тела Бенс-Джонса обладают соответствующими свойствами. Наиболее достоверно выявление этого парапротеина осаждением его при температуре 40—60 °С, но и в этих условиях осаждение может не произойти в слишком кислой (рН < 3,0—3,5) или слишком щелочной (pH > 6,5) моче, при низкой относительной плотности мочи и при низкой концентрации белка Бенс-Джонса.

Необходимый реактивы:

2 М ацетатный буфер рН 4,9.

Ход исследования:

Профильтрованную мочу в количестве 4 мл смешивают с 1 мл буфера и согревают в течение 15 мин на водяной бане при температуре 56 °С. При наличии белков Бенс-Джонса уже в течение 2 мин появляется выраженный осадок, при концентрации белка Бенс-Джонса менее 3 г/л проба может получиться отрицательной. На практике это встречается крайне редко, так как большей частью концентрация белка Бенс-Джонса в моче значительная.

С полной достоверностью белок Бенс-Джонса может быть обнаружен иммуноэлектрофоретическим исследованием при использовании специфических сывороток против тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов.

Определение альбумоз (протеоз):

Альбумозы — это продукты расщепления белков, принцип определения которых основан на том, что они не сворачиваются при кипячении, но дают положительную биуретовую реакцию и высаливаются некоторыми солями, особенно сульфатом аммония и ацетатом цинка в кислой среде.

Нормальная моча альбумоз не содержит. Следы могут быть в нормальной моче в случае примеси семенной жидкости. В патологии альбумозы могут встречаться в моче при лихорадочных состояниях, переливании крови и плазмы, рассасывании экссудатов и транссудатов, распаде опухолей.

Необходимые реактивы:

1. Насыщенный раствор хлорида натрия.

2. Концентрированный раствор едкого натра.

3. Слабый раствор сульфата меди (почти бесцветный).

Ход исследования:

К моче, подкисленной уксусной кислотой, прибавляют насыщенный раствор хлорида натрия (1/3 объема), кипятят и горячую жидкость фильтруют. Альбумозы проходят в фильтрат, в котором их присутствие определяют биуретовой реакцией. К фильтрату прибавляют 1/2 объема концентрированного раствора едкого натра и несколько капель слабого раствора сульфата меди. При положительной пробе получается красно-фиолетовое окрашивание.

При положительной пробе с сульфосалициловой кислотой мочу нагревают. Если муть исчезает и вновь появляется при охлаждении, это означает, что моча содержит альбумозы или белковое тело Бенс-Джонса.

**3.3 Лабораторная работа № 3 Определение содержания калия, натрия и бикарбонатов в биосубстратах.**

Клинико-диагностическое значение исследования

Цель: ознакомить студентов с биохимическими методами исследования электролитного баланса и сформировать представления о лабораторном исследовании натрия и калия.

Известно, что среди всех ионов, содержание которых в биологических жидкостях (средах) определяют в клинико-диагностических лабораториях, только 4 являются электролитами. Это катионы натрий и калий, а также анионы хлорид и бикарбонат. Именно эти электролиты определяют ионную силу биологической среды - внеклеточной жидкости и ионного состава цитозоля. В организме выделяют два водных пространства: внутриклеточное и внеклеточное. Внеклеточное в свою очередь делят на внутрисосудистое (сыворотка, плазма крови) и внесосудистое (межклеточная жидкость).

Общее содержание воды в организме составляет 60% массы тела, при этом 2/3 приходится на внутриклеточную жидкость, 1/3 - на внеклеточную жидкость. 75% внеклеточной жидкости составляет интерстициальная жидкость, 25% внеклеточной жидкости - плазма крови. Химический состав вне- и внутриклеточной жидкости отличаются. Na+ - основной одновалентный катион внеклеточной жидкости, основной внутриклеточный катион - К+. Нарушение взаимоотношения вне- и внутриклеточных катионов - патогенетическое звено многих патологических процессов.

Биохимические методы исследования и клинико-диагностическое значение определения натрия и калия Обмен натрия в организме Общее количество натрия в организме около 105 граммов. Более 50 % - внеклеточная жидкость, в костях (депо) - 40%, внутриклеточное содержание 6 - 9%.

Физиологическая роль натрия:

1. Необходимо отметить, что натрий поддерживает осмотическое давление: замена другим осмотически активным катионом в концентрации, необходимой для поддержания осмолярности внеклеточной жидкости, не совместимо с жизнью.

2. Устанавливает движение воды, так 1 ммоль натрия удерживает около 6 мл воды.

3. Натрий принимает участие в регуляции КОС, так как он входит в состав буферных систем крови.

4. Определяет состояние нервно-мышечной возбудимости, тем что участвует в передаче возбуждения по нервно-мышечному волокну.

5. Поддерживает постоянство биоэлектрического потенциала мембран клеток: «калий-натриевый насос». Потребность натрия для взрослых составляет 4 – 5 граммов в сутки, а для детей – 1 ммоль/кг массы тела. Всасывание протекает наиболее активно в ободочной кишке. Оно усиливается при повышении концентрации в пище, при слабокислой рН – 4,4 – 6,8. Стимулируют всасывание: альдостерон, гидрокортизон, а угнетают: гастрин, холецистокинин, простогландины. Необходимо отметить, что натрий выводится с мочой, теряется 3-6 грамм в сутки (95%), а также с потом и калом – 5 %. Уровень натрия в организме регулируют нервная, эндокринная и мочевыделительная системы. Основным гормоном регуляции служит альдостерон.

Клинико - диагностическое значение определения концентрации натрия: в плазме крови содержание натрия составляет 135-145 ммоль/л. Уровень натрия в моче при разном пищевом режиме равен 40-220 ммоль/сут.

Гипернатриемия – повышение концентрации натрия в сыворотке крови, наблюдается при состоянии сильного потоотделения, несахарном мочеизнурении при патологических процессах в гипоталамической области мозга, болезни и синдроме Кушинга. При заболеваниях почек патофизиологические процессы меняют обмен натрия. Когда протеинурия возникает в результате первичного поражения фильтрационного барьера почечных телец и скорость клубочковой фильтрации не изменена, развивается гипопротеинемия. При этом задержка натрия в почках - следствие снижения объёма крови. Если снижение скорости клубочковой фильтрации первично, задержка воды и соли ведёт к увеличению объёма крови и повышению АД. Возможно сочетание обоих патологических процессов. Увеличение натрия в сыворотке крови отмечается также при заболеваниях печени и при заболеваниях ЦНС.

Гипонатриемия – снижение уровня натрия в сыворотке крови, встречается в клинике значительно чаще, сопровождая разнообразные патологические состояния. Наиболее частая причина гипонатриемии - применение диуретиков. Большинство диуретических препаратов активирует экскрецию натрия с мочой. Последствием этого может быть снижение общего содержания натрия в организме и уменьшение внеклеточного водного пространства. Низкая концентрация натрия в плазме крови характерна для заболеваний почек, при утрате их способности реабсорбировать катион из гломерулярного фильтрата. Это может привести к нарушению секреции воды. Гипонатриемия развивается также при застойной сердечной недостаточности, когда пациенты длительное время получают диуретические препараты. В начальных стадиях застойная сердечная недостаточность сопровождается гипонатриемией, вследствие активации секреции антидиуретического гормона. Гипонатриемия характерна также и для патологии ЖКТ. Диарея может привести к снижению концентрации натрия в сыворотке крови и экстрацеллюлярной жидкости. Наличие илеостомы всегда сопровождается гипонатриемией. При циррозе печени, несмотря на высокое содержание натрия в организме, содержание его в плазме крови может быть снижено. При первичной недостаточности надпочечников (болезнь Аддисона) альдостерон мало синтезируется это приводит к тому, что большое количество натрия выводится с мочой, что сопровождается развитием выраженной гипонатриемии. При сахарном диабете наличие кетоацидоза сопровождается усиленной потерей натрия в почках. В результате этого развивается гипонатриемия и снижение содержания натрия в организме. Гипонатриемия сопровождает выраженную гипергликемию.

Калий Калий (К+ ) – основной катион внутриклеточной жидкости; в ней содержится 98% калия всего организма. В организме человека с массой тела 70 кг содержится 3500 ммоль или 160 грамм калия. В клетках содержится 89-90% калия, в костях, соединительной ткани – 7,8 - 8%, в межклеточной жидкости – 1,8-2%, в плазме – 0,3-0,4%. Содержание калия в сыворотке крови – 3,6-5,3 ммоль/л, в эритроцитах – 79,9-99,3 ммоль/л. Депо калия в организме - мышечная ткань. Физиологическая роль калия: калий поддерживает осмотическое давление внутри клетки, обеспечивает кислото-основной гомеостаз в клетке, участвует в обеспечении трансмембранной разности потенциалов (калий-натриевый насос), участвует в передаче возбуждения по нервно-мышечному волокну, принимает участие в синтезе белка, глюкозы, гликогена. Потребность калия для взрослых в сутки составляет 50 - 102 ммоль, в организм человека калий поступает с растительной пищей. От 85 до 90% калия, принятого с пищей, выводят из организма почки. При отсутствии калия в пище в течение нескольких дней с мочой выделяется 40-60 ммоль/сут, после чего потеря калия с мочой уменьшается до 10-20 ммоль/сут. 10-15% потребленного с пищей калия выводится через ЖКТ. Регуляция уровня калия почками: ионы калия легко диффундируют через фильтрационный барьер почечных телец. Далее 50-70% калия реабсорбируется в проксимальном (извитом) сегменте нефрона. Выведение калия - это результат сочетания процессов фильтрации, реабсорбции и секреции.

В условиях гиперкалиемии в извитых канальцах подавляется реабсорбция калия. Клинические наблюдения показали, что КОС, скорость протекания мочи по дистальному канальцу, действие минералокортикоидов, поступление нереабсорбируемых в дистальном канальце анионов бикарбоната при почечном канальцевом ацидозе, некоторые антибиотики, могут изменить электрохимический потенциал мембраны клеток извитого канальца и оказывают влияние на экскрецию калия. Регуляция калия альдостероном: известно, что альдостерон повышает поступление калия в клетки и выведение его с мочой, но при этом он контролирует реабсорбцию в дистальных канальцах. При недостаточности коры надпочечников выведение калия с мочой уменьшаетс и может развиться гиперкалиемия. В то же время при гиперактивности коры надпочечников (гиперальдостеронизме) усиленная реабсорбция натрия приведет к усиленному выделению калия и угрожающей гипокалиемии (2,4-1,6 ммоль/л).

Калий и КОС: немаловажное влияние на уровень калия в плазме крови оказывает нарушение рН крови. При метаболическом ацидозе ионы водорода перемещаются внутрь клетки в обмен на внутриклеточный калий, что приводит к тканевой гипокалиемии. При алкалозе, наоборот, развивается гиперкалиемия. На уровень калия в плазме влияет содержание в крови аниона НСО, отражающее степень катаболических процессов. Известно, что экскреция калия в почках имеет циркадный ритм, наименьшие ее значения отмечены в ночное время, что отражает ритм секреции глюкокортикоидов. Экскреция К+ повышается в ответ на нагрузку этим катионом. Гиперкалиемия приводит к повышению секреции альдостерона, а он в свою очередь определяет транспорт калия в почках, а также в толстой кишке, слюнных и потовых железах. Введение большой дозы глюкокортикоидов вызывает гипокалиемию и повышает калийурез, который продолжается значительно дольше действия стероидов.

Инсулин и калий: установлено, что увеличение концентрации инсулина в крови приводит к понижению содержания калия, что происходит в результате поглощения калия миоцитами скелетных и сердечной мышц, клетками печени и жировой ткани. При сахарном диабете гиперкалиемия развивается легче, чем в норме. Инсулин способствует накоплению внутриклеточного калия независимо от уровня глюкозы в крови. Гиперкалиемия в свою очередь активирует секрецию инсулина клетками островков Лангерганса. При снижении или повышении содержания калия в крови нарушается поступление в клетки глюкозы и аминокислот.

Клинико - диагностическое значение определения концентрации калия: недостаточное потребление калия редко приводит к развитию гипокалиемии, повышенная экскреция калия почками - наиболее частая причина гипокалиемии. Выраженная гипокалиемия развивается в следующих ситуациях: 1) снижение поступления калия с пищей; 2) усиленная экскреция калия почками при приёме диуретиков, диуретическая фаза острой почечной недостаточности, гиперальдостеронизм, синдром и болезнь Кушинга; внепочечная потеря калия при диарее, профузной рвоте; 3) перераспределение калия между вне- и внутриклеточной жидкостью.

При уменьшении концентрации калия в сыворотке крови происходит ослабление рефлексов, гипотония мышц, слабость и астения. Некоторые случаи гипокалиемии приводят к явлениям паралича и даже рабдомиолиза. Ослабление тонуса гладкой мускулатуры при низком уровне калия может вызвать атонию желудка и парез кишечника, особенно на 2-3-й день послеоперационного периода. Необходимо отметить, что выраженная гипокалиемия приводит к нарушению проводимости и ритма, что отражается на ЭКГ (уменьшение амплитуды зубцов, инверсия зубца Т, расширение интервала S-T и появление зубца Q). При хроническом дефиците калия увеличиваются размеры сердца, возникают нарушения ритма, а при резком снижении уровня калия в плазме возможна остановка сердца в систоле. Диагностика нарушения обмена калия: для того чтобы установить причину гипокалиемии необходимо провести подробный сбор анамнеза и результатов лабораторного исследования. В анамнезе обращают внимание на прием диуретиков, слабительных, препаратов лакрицы, рвоту, диарею, прием алкоголя. При лабораторном обследовании определяют в плазме крови концентрацию калия и натрия, показатели КОС, концентрацию альдостерона и активность ренина. Определение в крови концентрации магния и кальция показано в случаях неясной причины гипокалиемии.

Гиперкалиемия - повышенное потребление калия с пищей редко приводит к гиперкалиемии, если при этом нет почечной или надпочечниковой недостаточности. Гиперкалиемия может развиваться в следующих случаях: 1) повышенное поступление калия (приём избытка калия при терапии диуретиками, переливание крови с просроченным сроком хранения); 2) перераспределение калия между водными пространствами (повреждение тканей, активация катаболических процессов, системный ацидоз); 3) снижение выведения калия (острая почечная недостаточность, хроническая почечная недостаточность, длительный приём калий сберегающих диуретиков, гипоальдостеронизм). Гиперкалиемия при недостаточности надпочечников (болезнь Аддисона) сопровождается низким уровнем натрия в плазме крови, гипокалиурией, высокой активностью ренина. Нарушения метаболизма углеводов при острой и хронической почечной недостаточности провоцируют гиперкалиемию и метаболический алкалоз. Признаки избытка калия: нейромышечные симптомы гиперкалиемии выражаются в парестезиях, а в более тяжелых случаях в восходящем параличе конечностей. Выраженность кардиальных симптомов зависит от степени повышения калия в плазме - от минимальных изменений на ЭКГ до серьезных нарушений ритма и проводимости (поперечная блокада и фибрилляция желудочков).

При концентрации калия выше 6 ммоль/л, как правило, обнаруживают изменения на ЭКГ, которые становятся более тяжелыми. При концентрации калия выше 10 ммоль/л сердце может остановиться в диастоле. При уровне калия выше 7 ммоль/л могут развиться аритмии сердца с летальным исходом. Гиперкалиемия (более 5 ммоль/л) отмечена в большом проценте случаев у детей, родившихся недоношенными. Ошибки исследования: клинические наблюдения показали, что основная причина высокого содержания калия в плазме крови - несоблюдение условий взятия крови. Наиболее частая ошибка - гемолиз. В ряде случаев при внутривенном введении калия по окончании инфузии из этой же иглы (катетера) берут кровь для исследования. В таких ситуациях лаборатория может определить содержание калия в плазме крови, превышающее 10 ммоль/л. Высокое количество тромбоцитов или лейкоцитов, что происходит при миелопролиферативных заболеваниях, может привести к псевдогиперкалиемии, это связано с повышенным выходом калия из клеток в случае определения калия в сыворотке крови, а не в плазме. В качестве антикоагулянта при определении калия и натрия следует применять не натриевую, а литиевую соль гепарина, избегать гемолиза. Методы определения натрия и калия: концентрацию натрия и калия измеряют сходными способами: методом пламенной атомно-эмиссионной спектроскопии (ПАЭС), потенциометрически при помощи ионоселективных электродов (ИСЭ), атомно-абсорбционной спектрометрией.

**3.4 Лабораторная работа № 4 Количественное определение хлоридов в моче**

Хлор - анион внеклеточной жидкости. В организме взрослого содержится примерно 2300 ммоль ионов хлора. Физиологическая роль хлора: хлор оказывает влияение на осмотическое давление внеклеточной жидкости, принимает участие в регуляции КОС внеклеточной жидкости, поддерживает газообменную функцию эритроцитов, задействован в обезвреживании продуктов патологического распада тканей это связано с тем, что сдвиг рН поврежденной ткани в кислую сторону за счет ионов хлора привлекает ионы натрия и воды, что нормализует рН. Суточная потребность составляет 1,5-5 грамм. Всасывание протекает в желудке, тонком кишечнике. Выводится преимущественно почками (6-8 грамм), а также желудочным соком и потом. Содержание в организме. В плазме крови содержится 95-100 ммоль/л, в эритроцитах – 45-54 ммоль/л. Обмен хлора между кровью и тканями связан с обменом натрия. В норме хлор пассивно следует за ионами натрия. Гиперхлоремия (повышение концентрации хлора в крови) - наблюдается при повышенном поступлении NaCl в организм, дегидратации, метаболическом ацидозе, гипервентиляции легких, гипокапнии, отеках и транссудатах из-за отечной задержки хлоридов, нефритах из-за снижения экскреции с мочой, при гипертонической болезни, сердечно-сосудистой недостаточности, приеме преднизолона и отравлении салицилатами. Гипохлоремия (снижение концентрации хлора в крови) - возникает при недостаточном поступлении хлора и избыточных потерях через ЖКТ при рвоте, полиурии и нарушении реабсорбции в почках (нефриты, ХПН, сморщенная почка и др.), усилении потоотделения, а также при повреждении тканей, в послеоперационном периоде, при травмах, абсцессах, некрозах изза усиления транспорта хлора в очаг поражения.

Определение количества хлоридов в моче имеет большое значение при диагностике отравления животных поваренной солью. В ряде случаев эти показатели являются единственным надёжным признаком отравле¬ния.

Принцип метода. Хлориды мочи оттитровываются раствором азот¬нокислой ртути в присутствии азотной кислоты и нитропруссида натрия.

Химизм реакции. Ионы хлора связываются в виде слабодиссоциированной хлорной ртути:

2NaCl+Hg(N03)2 > HgCl2 + 2NaNO3

По мере связывания ионов хлора, ионы ртути образуют осадок нитро-пруссида ртути:

Hg(NO3)2 + Na2[Fe(CN)5,NO] > Hg(Fe(Cl)5NO] + 2NaN03

Приборы. Воронка c сухим фильтром. Сухая колбочка или стакан. Бюретка. Пипетка на 5 мл. Цилиндр на 10 мл. Цилиндр на 10 мл. Коническая колба для титрования на 100 мл.

Реактивы. Ртуть азотнокислая окисная, 0,1 н раствор. Приготовление: к 7 мл концентрированной азотной кислоты добавляют мелкими порциями при осторожном помешивании 11г желтой окиси ртути. Объем раствора доводят дистиллированной водой до 1 л и устанавливают титр по 0,1 н. раствору. Для установления титра к 10 мл титрованного раствора HCl добавляется 8—10 капель концентрированной азотной кислоты, 3—4 капли 30%-ного раствора нитропруссида натрия и оттитровывают раствором азотнокислой ртути до появления мути, не исчезающей в течение минуты. Нитропруссид натрия, 30%-ный раствор. Азотная кислота, концентрированная.

Ход работы. 10—15 мл мочи фильтруют через бумажный фильтр в пробирку. 5 мл профильтрованной мочи перекосят в коническую колбу, куда добавляют 2—3 мл концентрированной азотной кислоты и 3—4 капли нитропруссида натрия.

Содержимое колбы титруется раствором азотнокислой ртути до помутнения раствора. Образовавшаяся муть не должна исчезать на протяжении минуты.

Расчет: 1 мл 0,1 н. раствора азотнокислой ртути связывает 0,00355 г хлора. Это соответствует 0,00585 г хлористого натрия. Допустим, на титрование 5 мл мочи пошло 15,30 мл азотнокислой ртути.

Тогда г хлористого натрия, или г хлора.

Процентное содержание хлористого натрия в данной пробе мочи будет составлять:

а хлора: 

Содержание хлоридов в моче домашних животных 0,6—0,9%.

**4. Учебно-методическое обеспечение дисциплины**

1. Лабораторные методы исследования в биохимии и молекулярной биологии Нотова С. В., Лебедев С. В., Сизова Е. А., Казакова Т. В., Маршинская О. В. учебное пособие ОГУ, 2019. https://www.osu.ru/iss/prepod/lk.php?page=getfile&science\_work=94443\_20190522
2. Биохимия [Электронный ресурс] : электронное гиперссылочное учебное пособие / А. В. Дудко, А. Д. Стрекаловская, Е. С. Хайруллина; М-во образования и науки Рос. Федерации, Федер. гос. бюджет. образоват. учреждение высш. проф. образования "Оренбург. гос. ун-т". - Электрон. текстовые дан. (1 файл: 245 Mb). - Оренбург : ОГУ, 2015. -Архиватор 7-Zip
3. 2 Теоретические основы биохимии [Электронный ресурс] : учеб. пособие / Е. С. Барышева, О. В. Баранова, Т. В. Гамбург; М-во образования и науки Рос. Федерации, Гос. образоват. учреждение высш. проф. образования "Оренбург. гос. ун-т". - Электрон. текстовые дан. (1 файл: Kb). - Оренбург : ГОУ ОГУ, 2011. -Adobe Acrobat Reader 5.0. Издание на др. носителе [Текст] . - ■ гос. регистрации 0321102524. <http://artlib.osu.ru/web/books/metod_all/11_20110615.pdf>

**Дополнительная литература**

1. Введение в элементологию [Электронный ресурс] : учебное пособие для студентов, обучающихся по программам высшего образования по направлению подготовки 06.04.01. Биология / И. В. Радыш [и др.]; М-во образования и науки Рос. Федерации, Федер. гос. бюджет. образоват. учреждение высш. образования "Оренбург. гос. ун-т". - Электрон. текстовые дан. (1 файл: 3.30 Мб). - Оренбург : ОГУ, 2017. - Загл. с тит. экрана. -Adobe Acrobat Reader 6.0 - ISBN 978-5-7410-1655-8.
2. Соколова, О. Я. Изучение минерального состава костной ткани [Электронный ресурс] : методические указания для обучающихся по образовательной программе высшего образования по направлению подготовки 06.04.01 Биология / О. Я. Соколова, Е. Ю. Гальцева; М-во образования и науки Рос. Федерации, Федер. гос. бюджет. образоват. учреждение высш. образования "Оренбург. гос. ун-т". - Оренбург : ОГУ. - 2018. - 17 с- Загл. с тит. экрана.

**Периодические издания**

|  |
| --- |
| 1. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины : журнал. - М. : Агентство "Роспечать", 2018. |
| 1. Журнал неорганической химии : журнал. - М. : Академиздатцентр "Наука" РАН, 2018. |
| 1. Журнал физической химии : журнал. - М. : Академиздатцентр "Наука" РАН, 2018. |
| 1. Клиническая лабораторная диагностика : журнал. - М. : Агентство "Роспечать", 2018. |
| 1. Прикладная биохимия и микробиология : журнал. - М. : Академиздатцентр "Наука" РАН, 2018. |
| 1. Химическая промышленность сегодня : журнал. - М. : Агентство "Роспечать", 2018. |
| 1. Экология : журнал. - М. : Академиздатцентр "Наука" РАН, 2018. |