

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Сибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Н.В. Канская, Т.В. Жаворонок,
Н.А. Жуйкова**

**ПРАКТИКУМ
ПО КЛИНИЧЕСКОЙ БИОХИМИИ**

Учебное пособие

Для студентов специальности «Сестринское дело»

Томск
Издательство СибГМУ
2018

УДК 577.1:616-008.9-074](075.8)
ББК 52.57я73
К 197

К 197 Канская Н.В. Практикум по клинической биохимии /
Н. В. Канская, Т. В. Жаворонок, Н. А. Жуйкова. –
Томск: Издательство СибГМУ, 2018. – 201 с.

Учебное пособие подготовлено в рамках дисциплины «Клиническая биохимия» в соответствии с Федеральным государственным стандартом высшего профессионального образования и предназначено для студентов, обучающихся по основной профессионально-образовательной программе 34.03.01 «Сестринское дело» с квалификацией «Академическая медицинская сестра. Преподаватель».

Практикум нацелен на освоение наиболее важных разделов клинической биохимии с акцентированием внимания на основах биохимии и основных аспектах клинической биохимии, необходимых для понимания будущими специалистами метаболизма человека в норме и при патологических процессах, приводящих к развитию заболеваний органов и тканей.

УДК 577.1:616-008.9-074](075.8)
ББК 52.57я73

Рецензент:

Т.Н. Бодрова – д.м.н., профессор кафедры пропедевтики внутренних болезней ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России.

Практикум утверждён и рекомендован к печати учебно-методической комиссией ФПМ и М ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России по направлению подготовки 34.03.01 «Сестринское дело» (протокол № 1 от 11 октября 2017 г.).

© Издательство СибГМУ, 2018
© Канская Н.В., Жаворонок Т.В., Жуйкова Н.А., 2018

ВВЕДЕНИЕ

Целью издания практикума по клинической биохимии является адаптация учебного процесса к новым требованиям доказательной медицины, которые базируются на развитии научных представлений о метаболизме организма человека, усовершенствовании методологии диагностики заболеваний, широком внедрении в клиническую лабораторную практику современных методов исследований. Актуальность практикума при обучении будущих специалистов определена необходимостью закрепления теоретического курса клинической биохимии, изучения эффективных подходов к оценке обмена веществ в органах и тканях, получения целостного представления о востребованных на современном этапе методах лабораторной диагностики и приобретения основ практических навыков по предмету.

Материал структурирован по отдельным темам согласно последовательности изучения разделов дисциплины. Вначале представлены базовые темы о строении и функциях белков (исходя из постулата «жизнь – это водная форма существования белковых тел»), основах обмена веществ и энергии, по их завершении реализован переход к вопросам регуляции и частной биохимии органов и тканей. Это позволяет расширить знания фундаментальных основ биохимии, уяснить особенности метаболизма в норме и при патологических процессах.

В предлагаемом варианте практикума обоснованы актуальность и цели каждого занятия, приведены вопросы для самостоятельной подготовки, руководство к проведению лабораторных работ с указанием практического или клинико-диагностического значения изучаемых показателей. В ряде случаев поставлены вопросы, ответ на которые позволяет студенту правильно оформить протокол исследования и понять диагностическое значение выполненного исследования.

Преподавание клинической биохимии требует от студента умения не только грамотно провести анализ, но и осознать клиническую значимость результатов.

В практикуме предложены тесты и ситуационные задачи для самоконтроля полученных знаний, вопросы к итоговым занятиям и семинарам по наиболее сложным темам итогового контроля знаний. Все это поможет студентам всесторонне осмыслить изучаемый материал и получить глубокие знания по предмету.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ	– аденозиндифосфат
АлАТ	– аланинаминотрансфераза
АсАТ	– аспартатаминотрансфераза
ГАМК	– гамма-аминомасляная кислота
ГМФ	– гуанозинмонофосфат
ГТТ	– глюкозотолерантный тест
ГТФ	– гуанозинтрифосфат
ДАГ	– диацилглицерол
ДВС	– диссеминированного внутрисосудистого свёртывания (синдром)
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНП	– дезоксирибонуклеопротеины
ДНФГ	– динитрофенилгидразин
ДХГБС	– дихлоргидроксибензолсульфонат натрия
ДХФИФ	– дихлорфенолиндофенол
ЖКТ	– желудочно-кишечный тракт
ИМФ	– инозинмонофосфат
ИФЗ	– инозитолтрифосфат
ИФА	– иммуноферментный анализ
КоА	– коэнзим А
КОС	– кислотно-основное состояние
ЛПНП	– липопротеины низкой плотности
ЛПВП	– липопротеины высокой плотности
ЛПОНП	– липопротеины очень низкой плотности
ЛХАТ	– лецитинхолестеролацилтрансфераза
МАГ	– моноацилглицерол
НАД+	– никотинамидадениндинуклеотид
НАДН	– никотинамидадениндинуклеотид восстановленный
НАДФ+	– никотинамидадениндинуклеотид фосфат
НАДФН	– никотинамидадениндинуклеотид фосфат восстановленный
ПАЛФ	– пиридоксальфосфат
ПДААБ	– пара-диметиламиноазобензол
ПОЛ	– перекисное окисление липидов
ПОМК	– проопиомеланокортин
ПТГ	– паратгормон
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РНК	– рибонуклеиновая кислота
РНП	– рибонуклеопротеины
РЭС	– ретикуло-эндотелиальная система
СПИД	– синдром приобретенного иммунодефицита
ТАГ	– триацилглицеролы
ТГФК	– тетрагидрофолиевая кислота
ТМФ	– тимидинмонофосфат
ТТГ	– тест на толерантность к глюкозе
ТХУ	– трихлоруксусная кислота

УДФГК	– уридиндифосфоглюкуроновая кислота
УМФ	– уридинмонофосфат
УТФ	– уридинтрифосфат
ФАД	– флавинадениндинуклеотид
ФАДН ₂	– флавинадениндинуклеотид восстановленный
ФАФС	– фосфоаденозинфосфосерная кислота
ФИФ ₂	– фосфатидилинозит фосфорилированный
ФМН	– флавинмононуклеотид
цАМФ	– циклический аденозинмонофосфат
цГМФ	– циклический гуанозинмонофосфат
ЦМФ	– цитозинмонофосфат
ЦНС	– центральная нервная система
ЦТК	– цикл трикарбоновых кислот (цикл Кребса, цикл лимонной кислоты)
ЦТФ	– цитозинтрифосфат
ЩФ	– щелочная фосфатаза
ЭДТА	– этилендиаминтетраацетат
EIA	– иммуноферментный анализ (Enzyme Immuno Assay), ИФА
ELISA	– ферментосвязанный иммуносорбционный анализ (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay), вариант ИФА
GLUT	– глюкозный транспортер (трансмембранный белок-переносчик глюкозы)
PCR	– полимеразная цепная реакция (Polymerase Chain Reaction), ПЦР
PCR-assay	– ПЦР-анализ (Polymerase Chain Reaction-assay)

ТЕМА 1. СТРОЕНИЕ, СВОЙСТВА, ФУНКЦИИ АМИНОКИСЛОТ И БЕЛКОВ

1. СТРОЕНИЕ, КЛАССИФИКАЦИЯ И РОЛЬ АМИНОКИСЛОТ. СТРУКТУРА МОЛЕКУЛ БЕЛКА

Актуальность

Известно, что жизнь – это способ существования белковых тел. Белки – важнейший пластический материал клеток живого организма, по структуре являются сложными полимерными соединениями, состоящими из аминокислот в качестве мономерных единиц. Именно особенностями аминокислот, составляющих полимер, обусловлено огромное разнообразие состава и структуры белков организма и их высокая индивидуальная специфичность. Знание структурной организации и свойств белковых молекул необходимо для понимания основных специфических функций (каталитической, регуляторной, рецепторной, транспортной и других), благодаря которым белкам принадлежит решающая роль во всех процессах жизнедеятельности. Вне состава белков аминокислоты участвуют в образовании биогенных аминов, азотистых оснований и мононуклеотидов, нейромедиаторов, липидов и других веществ. Ряд из них используется в качестве лекарств.

Цель

1. Знакомство со строением аминокислот, входящих в состав белков организма, классификациями аминокислот по биологической функции и строению бокового радикала. Изучение роли функциональных групп аминокислот.
2. Знакомство с уровнями организации белковых молекул. Изучение роли аминокислот в построении функционально активных молекул белков.
3. Приобретение практических навыков по проведению качественного анализа биологических жидкостей и растворов на присутствие аминокислот и белков, основанных на знании принципов цветных реакций (биуретовой, ксантопротеиновой, нингидриновой, Фоля).
4. Создание представления о значении определения аминокислот для анализа состава белков и диагностики нарушений азотистого обмена.

Вопросы для самоподготовки

1. Классификация аминокислот.
2. Основные физико-химические свойства аминокислот. Роль функциональных групп аминокислот, значение и разнообразие их свойств.
3. Незаменимые аминокислоты. Формулы и значение.
4. Пептидная связь. Строение, образование, свойства пептидной связи.
5. Пептиды: строение, название, растворимость, ионизация, заряд ($pH=7$), движение в электрическом поле, изоэлектрическая точка и влияющие факторы.
6. Роль белков в организме. Структура белковой молекулы.
7. Обнаружение аминокислот и белка в растворах.

Самостоятельная работа

Заполнить таблицу аминокислот (Приложение 1). Структурные формулы всех 20 протеиногенных аминокислот писать и запоминать в виде $\text{NH}_2\text{-CH-COOH}$

$$\begin{array}{c} | \\ \text{R} \end{array}$$

Лабораторная работа 1

Цветные реакции на белки и аминокислоты

Цветные реакции являются универсальными (биуретовая, нингидриновая и др.) или специфическими (реакция Фоля, Миллона и др.) качественными методами определения и позволяют обнаружить белок и аминокислоты в биологических пробах.

Реактивы

1) 0,5% раствор нингидрина, 2) 10% и 30% растворы NaOH, 3) 1% раствор CuSO_4 , 4) 5% раствор $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 5) 5% раствор нитропруссиды Na, 6) реактив Миллона, 7) конц. H_2SO_4 , 8) конц. HNO_3 .

Материал для исследования

1) 1% водный раствор яичного белка (имеет полный набор аминокислот).

Ход работы

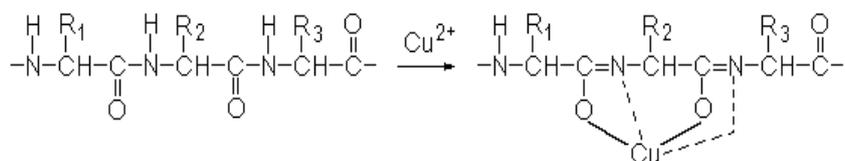
В пронумерованные пробирки наливают по 5 капель исследуемой жидкости. Руководствуясь приведёнными ниже указаниями, проделывают цветные реакции, наблюдают результаты и записывают выводы в таблицу.

БИУРЕТОВАЯ РЕАКЦИЯ

Универсальная реакция на обнаружение пептидной связи в белках и пептидах. Биуретовую реакцию дают вещества, содержащие не менее 2 пептидных групп.

Принцип реакции

Пептидные группы белков образуют в щелочной среде с ионами Cu^{2+} комплексное соединение фиолетового цвета с красным или синим оттенком в зависимости от числа пептидных связей и состава аминокислот. Интенсивность окраски пропорциональна числу пептидных групп.



Проведение анализа

В пробирку с исследуемой жидкостью вносят 3 капли 10% NaOH и каплю 1% CuSO_4 .

НИНГИДРИНОВАЯ РЕАКЦИЯ

Это универсальная реакция для обнаружения α -аминогрупп, содержащихся в аминокислотах, пептидах, белках.

Принцип метода

Взаимодействуя с нингидрином, α -аминогруппа аминокислот образует комплексное соединение синего или сине-фиолетового цвета: при нагревании ами-

нокислот с нингидрином происходит окислительное дезаминирование α -аминогрупп и восстановление нингидрина, который реагирует с молекулой аммиака и другой молекулой окисленного нингидрина с образованием окрашенного продукта. Иминокислоты (пролин и оксипролин) дают продукт жёлтого цвета.

Проведение анализа

Исследуемую жидкость смешивают с 5 каплями раствора нингидрина. Пробирки нагревают и кипятят 1 мин. Отмечают появление сине-фиолетового окрашивания.

КСАНТОПРОТЕИНОВАЯ РЕАКЦИЯ

Выявляет ароматические аминокислоты (фенилаланин, тирозин, триптофан).

Принцип метода

Ароматическое кольцо при взаимодействии с концентрированной азотной кислотой образует динитросоединение жёлтого цвета.

Проведение анализа

К исследуемому раствору добавляют 2 капли конц. HNO_3 и осторожно нагревают. Наблюдают появление жёлтого окрашивания, переходящего в оранжевое при добавлении 30% NaOH .

РЕАКЦИЯ ФОЛЯ

Выявляет аминокислоты со слабо связанной серой (цистеин, цистин).

Принцип метода

Сульфгидрильные группы в белках подвергаются щелочному гидролизу, в результате сера отщепляется в виде сульфида натрия, далее Na_2S может вступать в реакцию с $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ и даёт чёрный или бурый осадок сульфида свинца.

Проведение анализа

Исследуемый раствор и 5 капель 30% NaOH кипятят 1–2 минуты. К 5 каплям гидролизата добавляют 1 каплю раствора уксусно-кислого свинца и нагревают до кипения. Отмечают появление бурого или чёрного осадка.

Практическое значение

Реакции на аминокислоты и белок могут быть полезны при изучении состава веществ, установлении белковой природы веществ и оценке количества белка. Цветные реакции используют в биохимических исследованиях и в клинико-биохимических лабораториях для обнаружения белка и аминокислот и оценки содержания белка в биологических жидкостях, в фармацевтической практике для качественного анализа белковых лекарственных средств.

В медицине, фармации, косметологии, биологии широкое применение нашли аминокислотные гидролизаты, получаемые при промышленном гидролизе белков и содержащие полный набор заменимых и незаменимых аминокислот.

Оформление работы

Результаты оформляют в виде таблицы. Интенсивность окраски помечают следующим образом: – отсутствие; + слабая; ++ сильная; +++ очень сильная. В выводе указывают, какие вещества обнаружены в составе яичного альбумина.

Исследуемый материал	Реакция				Что содержится
	Биуретовая	Нингидриновая	Ксантопротеиновая	Фоля	
Яичный белок (альбумин)					

Лабораторная работа 2

Исследование наличия белка и свободных аминокислот в биологическом материале

Химический состав биологических жидкостей (кровь, моча, желудочный сок, слюна и т.п.) характеризуется постоянством и отражает состояние биохимических процессов, происходящих в органах и тканях. Отклонение от нормы в качественном и количественном составах биологических жидкостей может быть показателями патологического процесса.

Материал для исследования

Сыворотка крови, моча, слюна.

Реактивы

1) 0,5% раствор нингидрина, 2) 10% раствор NaOH, 3) 5% раствор CuSO₄, 4) 10% раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ).

Проведение анализа

В 1-ю пробирку добавляют 5 капель сыворотки, во 2-ю – 5 капель слюны, в 3-ю – 5 капель мочи. В пробах проводят биуретовую реакцию, определяя наличие/отсутствие белка в пробах.

Дальнейшие действия зависят от наличия или отсутствия белка в пробах:

- 1) если жидкость не содержит белок, то её в количестве 10 капель помещают в другую пробирку, где проводят нингидриновую реакцию с целью определения наличия/отсутствия α -аминокислот;
- 2) если в биологической жидкости присутствует белок, то берут 20 капель жидкости, добавляют 5 капель 10% раствора ТХУ и нагревают до осаждения белка. Белок отделяют центрифугированием (реакцию проводят в центрифужной пробирке и после центрифугирования отбирают надосадок пипеткой в чистую пробирку) или фильтрованием через бумажный фильтр (предварительно смочив его водой). В безбелковой надосадке/фильтрате определяют наличие/отсутствие α -аминокислот нингидриновой реакцией.

Практическое значение

Состав биологических жидкостей в ходе формирования патологии изменяется, что выявляют при диагностике заболеваний и контроле лечения. Многие методы оценки метаболитов углеводного, липидного и других обменов требуют отсутствия в биожидкости белков, поэтому их удаляют до анализа путем осаждения и последующей фильтрации/центрифугирования. Цветные реакции на белок и аминокислоты используют для контроля полноты удаления белка из биожидкости и оценки наличия белка и аминокислот в биологических средах, в фармации для качественного анализа белковых лекарственных средств.

Оформление работы

Результаты анализа сыворотки крови, слюны, мочи на наличие белка и аминокислот заносят в таблицу. Делают вывод о содержании белка и аминокислот в указанных биологических жидкостях, поясняя причины и значение различий.

Объект исследования	Обнаруженные соединения	
	Белок	Свободные аминокислоты
Сыворотка крови		
Слюна		
Моча		

Вопросы для самоконтроля

1. Понятия «аминокислота», «пептид», «белок».
2. Элементарный состав и функции белков в организме.
3. Строение всех протеиногенных аминокислот, основные физико-химические свойства аминокислот. Роль функциональных групп.
4. Классификация аминокислот. Заменяемые и незаменимые аминокислоты.
5. Реакция образования пептидной связи, лежащей в основе построения первичной структуры белковой молекулы. Свойства пептидной связи. Построение пептида, название, заряд, движение в электрическом поле при разных значениях pH среды.
6. Уровни организации молекул белка, стабилизирующие связи. Биологический смысл появления различных уровней в структуре белка.

2. СОСТАВ И СВОЙСТВА БЕЛКОВ. МЕТОДЫ ОЧИСТКИ И ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛКОВ

Актуальность

Пути выделения белков из раствора при различных способах осаждения, в том числе высаливании и денатурации, широко используют в медицине для диагностических целей, получения и очистки белковых лекарственных препаратов.

Цель

1. Изучить физико-химические свойства белков (молекулярная масса, размеры, форма, ионизация, гидратация, растворимость) и основные типы структур белковых молекул.
2. Научиться осаждать белки из раствора разными методами и применять способность к осаждению белков в клинике (осадочные реакции).
3. Изучить способы разделения и очистки белков, усвоить использование методов разделения белков в клинике.

Вопросы для самоподготовки

1. Молекулярная масса белковых молекул. Способы ее определения (ультрацентрифугирование, гель-фильтрация).
2. Типы структур белковых молекул (первичная, вторичная, супервторичная,

- третичная, четвертичная). Стабилизирующие связи.
3. Глобулярные и фибриллярные белки. Сходство и различия в свойствах.
 4. Ионизация молекул белка (заряд), амфотерность, гидратация, растворимость. Свойства растворов белков. Принцип ионообменной хроматографии.
 5. Изоэлектрическая точка. Свойства аминокислот и белковых молекул в изоэлектрической точке (изоэлектрическое состояние).
 6. Свойства растворов белков. Факторы, стабилизирующие молекулы белков в растворе. Коллоидные свойства белков.
 7. Факторы денатурации белков: физические, химические и биологические.
 8. Механизмы денатурации и изменения структуры при денатурации белков. Свойства денатурированного белка.
 9. Способы удаления белка из раствора: осаждение кислотами, тяжелыми металлами, органическими растворителями. Принцип реакций осаждения.
 10. Способы очистки белковых растворов от примесей (высаливание, гель-фильтрация, диализ). Принципы методов.
 11. Ренативация, фолдинг, рефолдинг. Шапероны (белки теплового шока и др.).

Темы для реферативных сообщений

1. Биохимические основы доврачебной и первой врачебной помощи при отравлении органическими и неорганическими кислотами, солями тяжёлых металлов.
2. Принципы методов, области применения и эффективность диализа и плазмафереза в клинической практике.
3. Биохимические основы осадочных проб (тимоловой и Вельтмана), применение осадочных проб в диагностике заболеваний.

Лабораторная работа 1 Высаливание белков

Высаливанием называют процесс осаждения белка солями щелочных, щелочно-земельных металлов и нейтральными солями. Процесс высаливания обратим, так как сохраняет нативные свойства белков.

Реактивы

- 1) Насыщенный раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2) кристаллический порошок $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,
- 3) 10% раствор NaOH, 4) 1% раствор CuSO_4 .

Материалы для исследования

Сыворотка крови, раствор яичного белка.

Принцип

Под действием нейтральных солей, солей щелочных и щелочно-земельных металлов происходит нейтрализация заряда и дегидратация частиц белка. Используя разные концентрации солей, можно разделить белки на фракции. При растворении молекул осаждённого белка в воде происходит восстановление его исходных биологических, физико-химических свойств.

Проведение анализа

Параллельно с высаливанием раствора яичного белка проводят аналогичное осаждение и разделение белков сыворотки крови.

К 20 каплям яичного белка (или сыворотки крови) добавляют равный объём насыщенного раствора сульфата аммония и получают полунасыщенный раствор, в котором выпадает осадок яичного глобулина (или глобулинов крови). Через 5 мин осадок отделяют фильтрованием с помощью воронки с бумажным фильтром. Наличие белка на фильтре доказывают биуретовой реакцией, защелачивая среду 10% NaOH и добавляя 1% CuSO₄ для цветной реакции.

Часть прозрачного фильтрата отбирают пипеткой в чистую пробирку. Наличие альбуминов в фильтрате доказывают, добавляя растворы 10% NaOH и 1% CuSO₄ для проведения биуретовой реакции.

К оставшемуся фильтрату добавляют порошок сульфата аммония до полного насыщения раствора, при этом выпадает выраженный осадок альбуминов. Для проверки обратимости осаждения к осадку альбуминов добавляют 1–2 мл дистиллированной воды, осадок полностью растворяется.

Оформление работы

Отмечают принцип метода, регистрируют результаты анализа и делают вывод о возможности очистки/разделения мелкодисперсных и грубодисперсных белков данным методом.

Практическое значение

В клинических лабораториях проводится разделение альбуминов и глобулинов, определение их соотношения в сыворотке крови. В норме соотношение альбумин/глобулин в сыворотке крови колеблется в пределах 1,5–2,3 и изменяется при патологии: например, при воспалительных заболеваниях увеличивается содержание глобулинов и снижается концентрация альбуминов.

Лабораторная работа 2 **Исследование денатурации белков**

Денатурацией называют изменение структурной организации белковой молекулы (чаще третичной, четвертичной и даже вторичной структуры), приводящее к изменению физико-химических и биологических свойств. Обратимой денатурация может быть только при сохранении первичной структуры белка и возврате молекулы в оптимальные для неё или близкие к таковым условия.

Денатурирующие факторы подразделяют на химические (минеральные и органические кислоты, щёлочи, тяжёлые металлы и др.), физические (ультразвук, высокая температура, радиация и др.) и факторы биологического характера (протеолитические ферменты – трипсин, пепсин и др.). Большинство химических агентов вызывает необратимую денатурацию белков.

Реактивы

1) 20% раствор сульфосалициловой кислоты, 2) 10% раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ), 3) конц. HNO₃, 4) конц. H₂SO₄, 5) 1% раствор CuSO₄, 6) 5% раствор Pb(CH₃COO)₂, 7) танин, 8) ацетон, 9) этанол, 10) 1% и 10% растворы CH₃COOH, 11) насыщенный раствор NaCl, 12) 10% раствор NaOH.

Материалы для исследования

Сыворотка крови, яичный белок (1% водный раствор).

ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕПЛОВОЙ ДЕНАТУРАЦИИ БЕЛКОВ ПРИ НАГРЕВАНИИ В РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ

Принцип

Тепловая денатурация влияет на заряд и гидратную оболочку белков, снижая их гидрофильность и устойчивость в растворе. Денатурированный белок подвержен воздействию электролитов (ионы Na^+ и Cl^-) и изменениям pH среды.

Проведение анализа

В 5 пронумерованных пробирок наливают по 10 капель раствора яичного белка.

- В 1-ю пробу добавляют 2 капли дистиллированной воды (контроль, нейтральная среда), нагревают на кипящей водяной бане. Наблюдают помутнение раствора вследствие термической денатурации белка.
- Во 2-ю пробу добавляют 2 капли 1% раствора CH_3COOH (слабокислая среда), нагревают в кипящей водяной бане. Наблюдают сначала помутнение (белок теряет заряд, приближаясь к изоэлектрическому состоянию), при дальнейшем нагревании – белые хлопья осадка.
- В 3-ю пробу добавляют 2 капли 10% раствора CH_3COOH (сильнокислая среда), нагревают в кипящей водяной бане. Обычно осадок не образуется, так как частицы денатурированного белка перезаряжаются и приобретают положительный заряд.
- В 4-ю пробу добавляют 2 капли 10% раствора CH_3COOH и 1 каплю насыщенного раствора NaCl (сильнокислая среда и электролит), кипятят в водяной бане. Осадок выпадает много, так как ионы Na^+ и Cl^- нейтрализуют заряд на частицах денатурированного белка.
- В 5-ю пробу добавляют 2 капли 10% раствора NaOH (щелочная среда), нагревают на кипящей водяной бане. Осадок нет, так как отрицательный заряд на частицах денатурированного белка усиливается.

Оформление работы

Результаты оформляют в виде таблицы, отмечая интенсивность выпавшего осадка: – отсутствие; + слабый; ++ сильный; +++ очень сильный. Для каждого случая делают вывод о механизмах осаждения белка.

№	Реактивы	pH	Итог	Вывод
1	H_2O			
2	1% CH_3COOH			
3	10% CH_3COOH			
4	10% CH_3COOH и насыщенный NaCl			
5	10% NaOH			

ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОЙ ДЕНАТУРАЦИИ БЕЛКОВ

Проведение анализа

Берут 2 ряда пробирок, помещая каждый ряд в отдельный штатив и нумеруя от 1 до 11. В 1-й ряд пронумерованных пробирок вносят по 5 капель 1% раствора яичного белка, во 2-й ряд – по 5 капель сыворотки крови. В каждый ряд проби-

рок добавляют реактивы, пользуясь указаниями приведённой ниже таблицы. После проведения всех реакций оценивают результаты и сравнивают изменения в соседних пробирках.

Затем для установления необратимости/обратимости осаждения белка во все пробирки к осадку добавляют 10–20 капель дистиллированной воды. Оценивают результаты, сравнивают с изменениями в соседних пробирках.

Денатурирующие агенты	№№ проб	Используемые реактивы	Число капель	Механизм и особенности реакции	Осадок		
Соли тяжелых металлов	1	Меди сульфат	2	Ионы металлов связываются с функциональными группами аминокислот, разрушая структуру белка в пространстве			
	2	Свинца ацетат	2				
Концентрированные минеральные кислоты				Влияют на заряд и строение молекул белка			
а) небольшие количества	3	Азотная Серная	2	Кислоты вызывают дегидратацию частиц, нейтрализацию комплексных соединений с белком. Оцените поведение белка в избытке кислот			
	4		2				
б) избыток	5	Азотная Серная	10				
	6		10				
Органические кислоты						Нейтрализуют заряд, образуют комплексы с белком	
	7	Трихлоруксусная	2			Осаждает только белки	
	8	Сульфосалициловая	2	Осаждает белки и полипептиды			
Алкалоиды	9	Танин	2	Образуют нерастворимые солеобразные соединения с основными азотистыми группами			
Органические растворители	10	Ацетон	5	Нарушают гидрофобные взаимодействия внутри молекулы белка			
	11	Этанол	5				

Практическое значение

Реакции химической денатурации используют для осаждения белка в биологических жидкостях; связывания солей тяжелых металлов при лечении отравлений и для профилактики их на производстве; обезвреживания отходов в санитарной практике; дезинфекции кожи при обработке раневой поверхности.

Оформление работы

Регистрируют результаты работы в таблице, оценивая интенсивность денатурации белков по выпадающему осадку: – отсутствие; + слабая; ++ сильная; +++

очень сильная. В конце таблицы делают общий вывод по химической денатурации белка, особенностям действия отдельных денатурирующих агентов и обратимости химической денатурации белков.

Вопросы для самоконтроля

1. Основные физико-химические свойства белковых молекул.
2. Основные типы структур и уровни организации белковых молекул.
3. Методы очистки белков. Анализ первичной структуры и состава белковых молекул.
4. Свойства белковых растворов, факторы стабилизации белков в растворе.
5. Пути выделения белковых веществ, способы осаждения и удаления белка из растворов.
6. Денатурация белковых молекул, типы денатурации, условия обратимости.
7. Виды денатурирующих агентов, механизмы действия на молекулы белков.
8. Ренативация белков. Фолдинг и рефолдинг. Шапероны, их виды и свойства.

3. КЛАССИФИКАЦИЯ И ФУНКЦИИ БЕЛКОВ. ПРОСТЫЕ И СЛОЖНЫЕ БЕЛКИ

Актуальность

Белки выполняют разнообразные специфические функции в организме – транспорт кислорода и других соединений, хранение и передача наследственной информации и т.д. Особенности строения белковых макромолекул и возникновение их изменений лежат в основе развития ряда патологических процессов. Изучение структуры белков необходимо для понимания их роли в организме, характера нарушений при некоторых заболеваниях (серповидно-клеточная анемия, наследственные нарушения биосинтеза белков и др.). Реакции открытия белковой части и протетической группы позволяют понять состав и строение сложных белков, а также использовать эти данные для реакций количественного определения.

Цель

1. Освоить методы выделения сложных белков из различных объектов и проводить качественные реакции на компоненты сложных белков.
2. Изучить структуру и свойства сложных белков: фосфопротеинов, гликопротеинов, флавопротеинов и других.

Вопросы для самоподготовки

1. Строение протеиногенных аминокислот, свойства боковых радикалов аминокислот в составе молекул белков, взаимодействие с небелковой частью.
2. Классификация белков по функциональным признакам, основные представители классов.
3. Классификации белков по строению.
4. Простые белки. Характеристика, особенности строения и функции классов простых белков (протамины, гистоны, альбумины, глобулины и др.).

5. Общая характеристика, особенности строения сложных белков.
6. Фосфопротеины: строение и функции.
7. Хромопротеины. Разнообразие небелковой части (гемо-, флаво-, ретиналь-протеины и др.), функции, основные представители. Понятие о строении витаминов В₂, А, гема, гемоглобина и миоглобина.
8. Металлопротеины: понятие о строении и связях, основные представители, роль в транспорте и депонировании металлов, металлоферменты.
9. Гликопротеины: строение, связь с небелковым компонентом, состав углеводного компонента, функции в организме. Сходство и различия гликопротеинов и протеогликанов.
10. Протеогликаны: функции, представление о строении простетической группы (углеводный кор, пример его построения и связи с белком, участие гликозиламиногликанов – хондроитинсульфатов и др.).
11. Липопротеины мембран, строение. Структура транспортных липопротеинов, функции апобелков, основные транспортные формы липидов плазмы – хиломикроны, липопротеины очень низкой, низкой и высокой плотности (ЛПОНП, ЛПНП и ЛПВП). Понятие о "патологических" липопротеинах.

Темы для реферативных сообщений

1. Актин, миозин – особенности строения и функции мышечных белков.
2. Коллаген, эластин, кератин – строение и функции структурных белков.
3. Гликопротеины, протеогликаны – сходство и отличия строения и функций.
4. Разнообразие связей белка и небелкового компонента в сложных белках.
5. Структурные и транспортные липопротеины – особенности строения, функций.

Лабораторная работа 1

Выделение и анализ составных компонентов сложных белков

Качественные реакции на небелковые компоненты используют для обнаружения сложных белков в различных объектах в биологии, экологии, медицинской и судебно-медицинской практике.

Реактивы

- 1) 1% раствор тимола в этаноле, 2) 10% раствор NaOH, 3) молибденовый реактив, 4) конц. H₂SO₄, 5) 1% раствор CuSO₄, 6) 10% раствор CH₃COOH, 7) конц. CH₃COOH.

АНАЛИЗ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ФОСФОПРОТЕИНОВ

Материал для исследования

Молоко.

Проведение анализа

К 2,0 мл молока приливают 2,0 мл дист. воды, перемешивают. Добавляют для подкисления 2 капли конц. CH₃COOH (при pH 4,7 молоко свертывается, в осадок выпадает белок казеиноген). Полученный хлопьевидный осадок белка отфильтровывают на воронке с бумажным фильтром. Осадок на фильтре делят на

2 части: с 1-й частью проводят качественную реакцию на белок, 2-ю переносят в пробирку и определяют наличие фосфорной кислоты в казеиногене.

1) Молибденовая проба на фосфорную кислоту

Принцип

Фосфорная кислота реагирует с молибденово-кислым аммонием в азотной кислоте, образуя комплекс аммония фосфомолибдата лимонно-жёлтого цвета.

Проведение реакции

Половину осадка снимают палочкой с фильтра в химическую пробирку, добавляют 20 капель молибденового реактива, нагревают 30–60 секунд в кипящей водяной бане для развития окраски. После охлаждения пробирки в осадок выпадает желтый фосфомолибдат аммония.

2) Биуретовая реакция на белок

Принцип

Пептидная группа образует в щелочной среде с ионами Cu^{2+} комплексное соединение фиолетового цвета с красным или синим оттенком в зависимости от числа пептидных связей (не менее 2-х) и состава аминокислот.

Проведение реакции

К оставшейся на фильтре части осадка добавляют 10 капель 10% раствора NaOH для защелачивания и 1 каплю 1% раствора CuSO_4 , развивается характерная окраска.

АНАЛИЗ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ГЛИКОПРОТЕИНОВ

Материал для исследования

Слюна.

Проведение анализа

В две мерные центрифужные пробирки собирают по 1,0 мл слюны, далее в обе пробирки по каплям очень медленно приливают концентрированную уксусную кислоту до появления сгустка муцина, удаляют жидкую часть проб – насколько это возможно.

Проводят реакции на обнаружение компонентов гликопротеинов: в 1-й пробирке – углеводного, во 2-й пробирке – белкового.

1) Реакция Молиша на углеводные группы

Принцип

После дегидратации пентоз серной кислотой образуется гидроксиметилфурфурол, который при конденсации с тимолом даёт соединение, окрашивающее жидкость в красный цвет, что проявляется в виде тёмно-розового кольца.

Проведение реакции

Из 1-й пробирки жидкость аккуратно сливают, к сгустку муцина добавляют 2–3 капли раствора тимола, перемешивают. Осторожно по стенке добавляют концентрированную серную кислоту и, не перемешивая, оставляют пробирку на несколько минут для развития характерной темно-розовой окраски на границе раздела между находящейся на дне серной кислотой и находящейся выше жидкой частью пробы.

2) Биуретовая реакция на белок

Принцип

Пептидная группа образует в щелочной среде с ионами Cu^{2+} комплексное соединение фиолетового цвета с красным или синим оттенком в зависимости от числа пептидных связей (не менее 2-х) и состава аминокислот.

Проведение реакции

Во 2-ю пробирку добавляют 10 капель 10% раствора NaOH для нейтрализации кислоты. Затем добавляют еще 10 капель 10% раствора NaOH и 1 каплю 1% раствора CuSO_4 .

Оформление работы

Отмечают принцип каждого метода, результаты заносят в таблицу и делают вывод о наличии обнаруживаемого компонента в составе сложных белков.

Объект	Сложные белки	Выявляемый компонент	Окраска	Вывод
Слюна	Глико-протеины	Белок		
		Углеводы		
Молоко	Фосфо-протеины	Белок		
		Фосфорная кислота		

Лабораторная работа 2

Обнаружение небелкового компонента гемопротеинов в биологических пробах

Гемопротеины – сложные белки, состоящие как из одной, так и из нескольких субъединиц. Общим в их структуре является наличие железа в составе гема. В организме выполняют разнообразные функции, связанные с присутствием кислорода: транспорт и хранение O_2 , использование его в окислительно-восстановительных реакциях метаболизма. Наиболее известными гемопротеинами являются гемоглобин, миоглобин, цитохромы, каталаза, пероксидазы.

Принцип

Метод основан на бензидиновой пробе – специфической реакции на гем гемоглобина. Добавление бензидина и H_2O_2 к следам крови в биопробах приводит к окислению бензидина до дифенохинондимина синего цвета, вскоре преобразующегося в продукты красного цвета. Гем выступает катализатором реакции.

Реактивы

1) 0,2% спиртовой раствор бензидина, 2) 3% раствор H_2O_2 , 3) этанол.

Материалы для исследования

Разведенная дистиллированной водой цельная кровь. Патологический желудочный сок со следами крови. Патологическая моча со следами крови.

Проведение анализа

В 1-ю пробирку помещают 0,5 мл дистиллированной воды. Берут из пальца 2 капли крови (место взятия предварительно обрабатывают тампоном, смочен-

ным этанолом), добавляют их в пробирку и тщательно перемешивают. Во 2-ю пробирку добавляют 0,5 мл патологического желудочного сока, в 3-ю пробирку – 0,5 мл патологической мочи. Во все три пробирки прибавляют по 5 капель 0,2% спиртового раствора бензидаина и по 5 капель 3% раствора H_2O_2 . Жидкость в пробирках приобретает синюю окраску, которая очень быстро переходит в красную.

Практическое значение

В клинической диагностике пробу применяют для обнаружения малых количеств крови в биологических средах (желудочный сок, моча, кал и т.д.), в судебно-медицинской практике – для доказательства наличия кровяных пятен.

Оформление работы

Отмечают принцип метода, регистрируют результаты и делают вывод.

Вопросы для самоконтроля

1. Классификации белков по химическому строению и функциям.
2. Основные группы простых белков, характеристика и особенности каждой.
3. Строение и функции сложных белков, связь белка с небелковой частью, роль отдельных классов сложных белков и их типичных представителей.
4. Организация и роль транспортных липопротеинов плазмы крови.

ТЕМА 2. НУКЛЕОТИДЫ, НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ, НУКЛЕОПРОТЕИНЫ: СТРУКТУРА, СВОЙСТВА, ФУНКЦИИ

Актуальность

Существуют два типа нуклеопротеинов: дезоксирибонуклеопротеины (ДНП) и рибонуклеопротеины (РНП). Они играют важную роль в хранении и реализации наследственной информации. Мононуклеотиды – структурные компоненты нуклеиновых кислот, выполняют и другие важные функции. Цикл АДФ–АТФ участвует в трансформации энергии окисления веществ в энергию для эндергонических процессов организма. Адениловый нуклеотид входит в состав коферментов дегидрогеназ (НАД, НАДФ, ФАД) и ацилирования (КоА). УТФ, ГТФ и ЦТФ – коферменты в реакциях переноса моносахаридных остатков, ЦТФ ещё и кофермент холинтрансферазы. Нуклеотиды присутствуют в активных формах глюкуроновой и серной кислот (УДФГК, ФАФС), участвующих в реакциях детоксикации. Циклические нуклеотиды 3'5'-цАМФ и 3'5'-цГМФ – вторичные посредники при передаче гормональных сигналов на внутриклеточные эффекторные системы. Все клетки организма могут синтезировать нуклеотиды, используя в качестве источника азота аминокислоты. Скоростью синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов определяется синтез нуклеиновых кислот.

К заболеваниям, связанным с патологией обмена нуклеопротеинов, относят подагру, мочекаменную болезнь, синдром Леша–Нихана, оротацидурию, мегалобластическую анемию и другие патологии. Нуклеотиды – лекарственные препараты успешно применяют в клинике.

Цель

1. Знакомство со строением и функциями пуриновых и пиримидиновых оснований, нуклеотидов, рибонуклеиновых и дезоксирибонуклеиновых кислот – ДНК и РНК, разнообразием и локализацией в клетке нуклеопротеинов, их ролью в жизнедеятельности клетки и целого организма.
2. Освоение анализа компонентов нуклеопротеинов и метода качественного определения (открытия) мочевой кислоты.

Вопросы для самоподготовки

1. Строение, связи, биологическая роль пуриновых, пиримидиновых нуклеотидов, важнейших моно- и динуклеотидов, циклонуклеотидов и нуклеозидтрифосфатов.
2. Нуклеотидные кофакторы, представление об их получении в организме, направлениях использования.
3. Виды нуклеиновых кислот, их сходство и различия, локализация в клетке, биологические функции, полианионный потенциал и его нейтрализация.
4. Состав ДНК, уровни организации и стабилизирующие связи, физико-химические свойства и биологическое назначение.
5. РНК: классификация, состав и особенности строения, уровни организации и стабилизирующие связи, биологические функции. Малые РНК, рибозимы.

6. Понятие о метаболических и биологических взаимосвязях аминокислот и нуклеиновых кислот: аминокислоты – предшественники азотистых оснований нуклеотидов, нуклеиновые кислоты – предшественники белков. Формулы аминокислот, поставляющих атомы для синтеза азотистых оснований.
7. Мочевая кислота как представитель пуринов, свойства, происхождение и роль в организме, значение в клинике (выпадение кристаллов мочевой кислоты в суставах, образование мочевых камней).
8. Строение нуклеопротеинов, значение в жизнедеятельности клетки, разнообразие структур белковой и небелковой частей. Роль белков информосом и рибосом в нуклеопротеиновых комплексах.
9. Особенности аминокислотного состава и строения простых белков гистонов и протаминов, их разнообразие, локализация в клетке, биологическое значение, роль в стабилизации нуклеиновых кислот.
10. Нуклеотиды – лекарственные препараты.

Лабораторная работа 1 **Обнаружение мочевой кислоты**

Мочевая кислота является конечным продуктом окислительного катаболизма пуриновых нуклеотидов.

Принцип

Мочевая кислота при окислении превращается в продукты (диалуровая кислота, аллоксан), которые конденсируются в аллоксантин. При действии аммиака на аллоксантин образуется пурпурная кислота, аммонийная соль которой (мурексид) обладает ярко-красным цветом, а калиевая соль – сине-фиолетовым.

Реактивы

1) Концентрированная HNO_3 , 2) концентрированный раствор NH_4OH , 3) 10% раствор KOH .

Материал для исследования

Кристаллы мочевой кислоты.

Проведение анализа

Кристаллы мочевой кислоты (общим объёмом не больше спичечной головки) помещают на дно фарфоровой чашки, смачивают каплями HNO_3 (осторожно!), выпаривают (не выше 70°C) досуха до проявления красновато-жёлтого пятна, распределяя раствор по дну чашки. После охлаждения пятно смачивают с одного края каплей аммиака – появляется пурпурно-красное окрашивание, с другого края пятно смачивают каплей раствора KOH – появляется сине-фиолетовое окрашивание.

Практическое значение

Мурексидную пробу используют для открытия мочевой кислоты в мочевых камнях и осадках.

Оформление работы

Отмечают принцип метода, регистрируют результаты и делают вывод.

Лабораторная работа 2

Анализ химического состава нуклеопротеинов

В составе нуклеопротеинов выделяют белковую часть, азотистые основания (пуриновые или пиримидиновые), углеводы (рибозу или дезоксирибозу) и фосфорную кислоту. В работе определяют наличие всех перечисленных групп компонентов.

Реактивы

1) 1% раствор тимола в этаноле, 2) 10% раствор NaOH, 3) концентрированный раствор NH_4OH (аммиак), 4) раствор молибденово-кислого аммония (молибденовый реактив), 5) концентрированная H_2SO_4 , 6) 1% раствор CuSO_4 , 7) 1% аммиачный раствор AgNO_3 .

Материал для исследования

Гидролизат дрожжей (готовят лаборанты: 1 г дрожжей кипятят 1 час с 20 мл 1% раствора H_2SO_4 и 20 мл дистиллированной H_2O в колбе с обратным холодильником, фильтруют).

ЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ НА КОМПОНЕНТЫ НУКЛЕОПРОТЕИНОВ

1) Биуретовая реакция – на белковый компонент

Принцип

Пептидные группы образуют в щелочной среде с ионами Cu^{2+} комплексное соединение фиолетового цвета с красным или синим оттенком в зависимости от числа пептидных связей в исследуемом пептиде или белке и состава аминокислот. Интенсивность окрашивания пропорциональна количеству пептидных групп.

Проведение реакции

В пробирке смешивают 5 капель гидролизата, 10 капель 10% раствора NaOH и 1 каплю 1% раствора CuSO_4 .

2) Серебряная проба – на пуриновые основания

Принцип

Пуриновые основания (аденин, гуанин), взаимодействуя с аммиачным раствором AgNO_3 , образуют через 5-10 мин рыхлый светло-коричневый осадок серебряных солей.

Проведение реакции

К 10 каплям гидролизата добавляют 10 капель концентрированного раствора NH_4OH и 10 капель 1% аммиачного раствора AgNO_3 . При стоянии образуется осадок характерной окраски.

3) Реакция Молиша – на углеводные группы

Принцип

Дегидратация пентоз серной кислотой приводит к образованию гидроксиметилфурфурола, который при конденсации с тимолом даёт соединение красного цвета, что проявляется в виде тёмно-розового кольца.

Проведение реакции

К 10 каплям гидролизата добавляют 2–3 капли раствора тимола, перемешивают. Осторожно по стенке добавляют концентрированную H_2SO_4 и, не перемешивая, оставляют на несколько минут для лучшего развития тёмно-розовой окраски на границе раздела H_2SO_4 и жидкой части пробы.

4) Молибденовая проба – на фосфорную кислоту

Принцип

Фосфорная кислота, взаимодействуя с молибденово-кислым аммонием в азотной кислоте, образует комплексное соединение фосфомолибдата аммония лимонно-жёлтого цвета.

Проведение реакции

К 10 каплям гидролизата добавляют 20 капель молибденового реактива. Нагревают в кипящей водяной бане. После охлаждения под струёй воды в пробирке выпадает осадок лимонно-жёлтого цвета.

Оформление работы

Отмечают принцип метода, заносят результаты в таблицу, делают вывод.

Объект	Выявляемый компонент	Окраска	Наличие в пробе
Дрожжи	Белок		
	Пуриновые основания		
	β -D-рибоза		
	Фосфорная кислота		

Вопросы для самоконтроля

1. Строение пуриновых и пиримидиновых азотистых оснований, нуклеозидов и нуклеотидов, трифосфатных и циклических производных нуклеотидов.
2. Биологический смысл разнообразия азотистых оснований нуклеотидов. Азотистые основания нуклеотидов, не входящих в состав нуклеиновых кислот, функции моно- и динуклеотидов в организме.
3. Классификация и локализация нуклеиновых кислот. Строение нуклеиновых кислот, уровни структурной организации и стабилизирующие их связи.
4. Разнообразие, структура и биологическая роль нуклеопротеинов, аминокислотный состав и значение их белкового компонента, химические связи между белковым и небелковым компонентами.
5. Ураты как конечный продукт пуринового обмена. Строение, происхождение мочевой кислоты, биологические нормы содержания в крови и моче.
6. Понятие о биологических и метаболических взаимосвязях между аминокислотами (белками) и нуклеиновыми кислотами.

Тестовые задания

Выбрать один правильный ответ.

1. СТРУКТУРНЫМ ЭЛЕМЕНТОМ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) моонуклеотид
- 2) глюкоза
- 3) аминокислота
- 4) глицерин

2. СТРУКТУРНЫМ ЭЛЕМЕНТОМ БЕЛКА ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) аминокислота
- 2) глюкоза
- 3) нуклеотид
- 4) глицерин

3. К БИОЛОГИЧЕСКИМ ПОЛИМЕРАМ НЕЛЬЗЯ ОТНЕСТИ

- 1) полипептиды
- 2) мукополисахариды
- 3) гликоген
- 4) гликокол

4. ГРУППА – NH₂ ИМЕЕТ ХАРАКТЕР

- 1) кислый
- 2) основной
- 3) нейтральный
- 4) амфотерный

5. ГРУППА – COOH ИМЕЕТ ХАРАКТЕР

- 1) кислый
- 2) основной
- 3) нейтральный
- 4) амфотерный

6. АМИНОКИСЛОТЫ ВЫЯВЛЯЮТСЯ МЕТОДОМ

- 1) хроматографии
- 2) рентгеноконтрастного анализа
- 3) определения характеристической вязкости

7. ДЛЯ БЕЛКОВ ХАРАКТЕРНО

- 1) наличие амфотерных свойств
- 2) отсутствие специфической молекулярной организации
- 3) сохранение структуры молекулы при кипячении
- 4) отсутствие способности кристаллизоваться

8. ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРОЙ БЕЛКА ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) конфигурация полипептидной цепи
- 2) способ укладки полипептидной цепи в определенном объеме
- 3) порядок чередования аминокислот в полипептидной цепи
- 4) количественный состав аминокислот в полипептидной цепи

9. ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРОЙ БЕЛКА ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) α -спираль, β -складчатость и аморфные участки
- 2) конфигурация полипептидной цепи
- 3) образование протомера
- 4) способ взаимодействия нескольких протомеров в пространстве

10. ТРЕТИЧНОЙ СТРУКТУРОЙ БЕЛКА ЯВЛЯЕТСЯ ОБРАЗОВАНИЕ

- 1) глобулы или фибриллы
- 2) порфирина
- 3) гема

Ситуационные задачи

1. Проведено осаждение белка из биологической жидкости, в которой создано 50%-ное насыщение сульфатом аммония. После отделения осадка жидкость стала прозрачной.

Пояснить, какие белки осаждаются в данных условиях. Указать, достигнута ли полнота осаждения белка и способ для подтверждения этого.

2. В биохимической лаборатории исследуется электрофоретическая подвижность белков.

Указать направление движения в электрическом поле (к аноду, катоду или остаются на старте) следующих белков:

- а) яичный альбумин при рН 5,0 (изоэлектрическая точка рН 4,6),
- б) β -лактоглобулин при рН 5,0 и 7,0 (изоэлектрическая точка рН 5,2),
- в) химотрипсиноген при рН 5,0; 9,5; 11,0 (изоэлектрическая точка рН 9,5).

ТЕМА 3. СТРОЕНИЕ, СВОЙСТВА И ФУНКЦИИ ФЕРМЕНТОВ

Актуальность

Ферменты – белковые молекулы, выполняющие в живой клетке функции биокатализаторов. Знания о строении и функционировании ферментов необходимы для изучения обмена веществ и его регуляции, для понимания патогенеза заболеваний, связанных с нарушением функционирования ферментов, и основ лекарственной терапии.

Цель

1. Знакомство со строением, свойствами, классификацией ферментов, особенностями ферментативного катализа.
2. Изучение основных механизмов регуляции действия ферментов.
3. Знакомство с методами обнаружения ферментов в тканях, биологических жидкостях, освоение способов измерения активности ферментов.
4. Знакомство с ферментами – лекарственными препаратами.

Вопросы для самоподготовки

1. Сходство и различия в действии ферментов и неорганических катализаторов.
2. Основные свойства ферментов: специфичность, термолабильность, зависимость активности от рН среды, концентрации субстрата.
3. Структурно-функциональная организация ферментов: простые и сложные белки-ферменты, полиферментные комплексы. Понятия «холофермент», «апофермент», «кофактор». Основные кофакторы (витамины, минералы и др.), классификация.
4. Изоферменты, множественные формы ферментов, их биологический смысл.
5. Механизмы катализа. Принципы теорий Фишера «ключ-замок», Кошленда об индуцированном соответствии, гипотезы топохимического соответствия.
6. Регуляция ферментативной активности: влияние активаторов и ингибиторов, аллостерические механизмы, ковалентная модификация (ограниченный протеолиз присоединение-отсоединение фрагментов), белок-белковые взаимодействия, ассоциация-диссоциация протомеров, изменение количества фермента и концентрации субстрата в клетке. Компартаментализация.
7. Принципы современной номенклатуры и классификации ферментов. Примеры названий ферментов (эмпирические, рабочие, классификационные).
8. Классы ферментов: оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы, лигазы (синтетазы). Общая характеристика каждого класса, основные подклассы, биохимическая роль, примеры реакций (приложение 3).
9. Принципы количественного определения активности ферментов. Единицы активности ферментов (в системе «СИ» и другие).
10. Практическое использование ферментов в медицине: энзимопатология, энзимодиагностика, энзимотерапия.
11. Применение ферментов, их ингибиторов в качестве лекарственных средств.

Лабораторная работа 1

Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры

Реактивы

1) 1% раствор крахмала, 2) раствор Люголя.

Материал для исследования

Слюна, разведенная 1:10 (источник α -амилазы). Приготовление разведения: 1–2 минуты тщательно ополаскивают рот 50 мл воды, в центрифужную пробирку собирают 1 мл слюны, избегая вспенивания (объем пены не учитывают), доводят дистиллированной водой до метки 10 мл, хорошо перемешивают.

Принцип

Гидролиз крахмала под действием амилазы проходит до дисахарида мальтозы через стадии образования декстринов. Нерасщепленный крахмал с йодом даёт синее окрашивание. Декстрины, в зависимости от размера молекул, окрашиваются йодом: амилодекстрины в фиолетовые тона, эритродекстрины в красно-бурые, ахродекстрины и мальтоза не окрашиваются – жёлтый цвет соответствует цвету водного раствора йода.

Проведение реакции

1. В пробирки (1, 2, 3, 4) вносят по 10 капель крахмала (раствор субстрата). В следующие пробирки (5, 6, 7, 8) – по 10 капель разведенной слюны (источник α -амилазы). Пробирки делят по парам: 1-5, 2-6, 3-7, 4-8.
2. Первую пару пробирок (1 и 5) помещают в баню со льдом (0°C). Вторую пару (2 и 6) оставляют при комнатной температуре ($18-22^{\circ}\text{C}$). Третью пару (3 и 7) помещают в водяную баню/термостат ($38-40^{\circ}\text{C}$). Четвертую пару (4 и 8) помещают в кипящую водяную баню (100°C).
3. Через 5 мин содержимое каждой пары пробирок объединяют, приливая раствор фермента к субстрату, инкубируют ещё 5 мин (условия те же).
4. Из 3-й пробирки отбирают на предметное стекло 3 капли смеси, добавляют каплю реактива Люголя (источник йода). Появление желтой окраски указывает на завершение гидролиза крахмала амилазой до мальтозы. В этом случае с содержимым остальных пробирок проводят ту же качественную реакцию (с каплей реактива Люголя), оценивают результат.
5. Если окраска в 3-й пробирке осталась фиолетово-бурых оттенков, продолжают инкубацию проб ещё 3 минуты в тех же условиях. Затем в каждую пробирку добавляют по 2 капли реактива Люголя, наблюдают развитие окраски.

Оформление работы

Указывают принцип метода, регистрируют результаты в таблице, делают вывод о зависимости скорости реакции от температуры

№	Температура инкубации	Окраска с йодом	Скорость реакции
1 + 5	0°C		
2 + 6	20°C		
3 + 7	$38-40^{\circ}\text{C}$		
4 + 8	100°C		

Лабораторная работа 2

Влияние активаторов и ингибиторов на активность амилазы

Принцип

Метод основан на сравнении скорости гидролиза крахмала под действием амилазы слюны до и после добавления ионов Cl^- и Cu^{2+} . Действие фермента на субстрат выявляется при помощи реакции с йодом.

Реактивы:

1) 1% раствор CuSO_4 , 2) 0,9% раствор NaCl , 3) раствор Люголя.

Материал для исследования

Слюна, разведенная 1:10 (источник α -амилазы).

Проведение реакции

Готовят три опытные пробы. В 1-ю пробирку помещают 10 капель дист. воды, во 2-ю – 10 капель раствора NaCl , в 3-ю – 10 капель раствора CuSO_4 . В каждую добавляют по 10 капель разбавленной слюны, перемешивают, добавляют по 10 капель раствора крахмала, перемешивают, инкубируют 5 мин при 37°C .

Готовят ещё три пробирки: в каждой из них по 1 мл воды и по 1–2 капли реактива Люголя. Отбирают из опытных проб по 5 капель содержимого и прибавляют в соответствующие пробирки. Сравнивают окраску 2-й и 3-й проб с 1-й пробой (в которой нет ионов-эффекторов). Если существенной разницы в окраске нет, инкубацию всех опытных проб увеличивают до 10 мин и повторяют качественный анализ на крахмал (с раствором Люголя).

Оформление работы

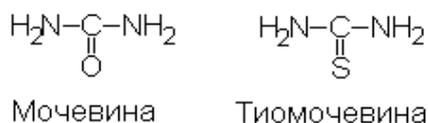
Указывают принцип метода, регистрируют результаты анализа и делают вывод о влиянии ионов хлора и меди на активность α -амилазы, поясняя, какой из них является активатором, а какой – ингибитором.

Лабораторная работа 3

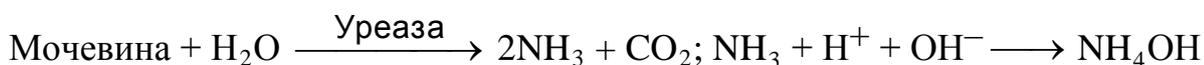
Оценка специфичности действия уреазы

Принцип

Метод основан на сравнении возможности гидролиза уреазой сходных по строению субстратов – мочевины и тиомочевины:



Специфичность действия уреазы обнаруживают по изменению окраски фенолфталеина (или лакмусовой бумаги) в присутствии аммиака, который образуется при ферментативном гидролизе мочевины и защелачивает среду.



Реактивы

1) 1% раствор мочевины, 2) 1% раствор тиомочевины, 3) 0,5% спиртовой раствор фенолфталеина, 4) лакмусовая бумага.

Материал для исследования

Препарат уреазы (препарат готовит дежурный для всей группы: очищает 3–4 семечка арбуза, зёрна тщательно растирает в ступке с 1 мл дистиллированной воды, доводит объём до 10 мл и фильтрует полученную эмульсию через воронку с двойным слоем марли; профильтрованную эмульсию используют как препарат уреазы).

Проведение реакции

В 1-ю пробирку помещают 10 капель раствора мочевины, во 2-ю – 10 капель раствора тиомочевины, затем в обе пробирки добавляют по 10 капель препарата уреазы и по 1–2 капле фенолфталеина, перемешивают, наблюдают за появлением яркой розовой окраски в одной из пробирок.

Оформление работы

Указывают принцип метода, регистрируют результаты анализа, делают вывод о специфичности действия уреазы (указывают тип специфичности) и её месте в классификации ферментов.

Отмечают возможность использования полученных данных при оценке результатов следующей лабораторной работы 4.

Лабораторная работа 4 Обнаружение ферментов разных классов

Реактивы

1) 1% раствор крахмала (субстрат), 2) раствор Люголя, 3) 3% раствор H_2O_2 , 4) 10% раствор глюкозы, 5) раствор метиленового синего (акцептор).

АНАЛИЗ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ КЛАССА ГИДРОЛАЗ

подкласс – гликозидазы

Материал для исследования

Слюна (разведение 1:10).

Принцип

α -Амилаза (1,4- α -D-глюкангидролаза, КФ 3.2.1.1.) катализирует гидролиз α -1,4-глюкозидных связей крахмала до мальтозы и декстринов. Присутствие данного фермента класса гидролаз обнаруживают по изменению окраски субстрата в реакции с реактивом Люголя. Крахмальный субстрат дает с йодом синюю окраску, декстрины (эритро-, хро-, мальтодекстрины и др.) в зависимости от длины фрагментов меняют окраску от сине-фиолетовой и красной на характерное для йода жёлтое окрашивание, мальтоза не окрашивается йодом.

Проведение анализа

Берут 3 пробирки. В каждую вносят по 5 капель крахмального субстрата и по 5 капель разведённой слюны (1:10). В 1-ю пробирку добавляют каплю раствора Люголя, наблюдают синюю окраску. Инкубируют 2-ю и 3-ю пробы 5 мин при 37°C. Во 2-ю пробу добавляют каплю раствора Люголя и наблюдают изменение окраски. Инкубируют 3-ю пробу ещё 5 мин при 37°C, добавляют каплю раствора Люголя, наблюдают дальнейшее изменение окраски.

Практическое значение

Амилаза присутствует не только в пищеварительном тракте, кровь содержит небольшое количество изоферментов амилазы – панкреатический Р-тип (около 30 %) и слюнной S-тип (около 70 %), попадающих в кровь в результате естественного старения и отмирания клеток слюнных и поджелудочной желёз. В сыворотке крови в норме активность амилазы 140–350 Е/л. Фермент имеет относительно низкую молекулярную массу (около 48 000 D), фильтруется в клубочках почек и проявляет активность в моче (диастаза мочи). Соотношение изоферментов в моче иное, чем в плазме крови: Р-тип – 70 %, S-тип – до 30 %. Активность альфа-амилазы в крови повышается, в основном, при заболеваниях поджелудочной железы (при остром панкреатите в 10–30 раз в крови и моче), растёт при поражении слюнных желёз, беременности, почечной недостаточности, кишечной непроходимости, заболеваниях жёлчных путей, диабетическом кетоацидозе, некоторых опухолях лёгких и яичников.

АНАЛИЗ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ КЛАССА ОКСИДОРЕДУКТАЗ

1) подкласс – каталазы

Материал для исследования

Свежая кровь.

Принцип:

Каталаза является ферментом геминовой природы, разлагает H_2O_2 на H_2O и O_2 .

Ход работы:

В пробирку наливают 10 капель 3% перекиси водорода и добавляют каплю крови. Наблюдают выделение пузырьков кислорода.

2) подкласс – анаэробные дегидрогеназы

Материал для исследования

1) Кипячёные дрожжи, 2) некипячёные дрожжи.

Принцип:

Анаэробные дегидрогеназы дрожжей (коферменты НАД⁺ и НАДФ⁺) катализируют перенос атомов Н от альдегидоспиртов, альдегидов на промежуточный субстрат (акцептор). Дегидрогеназы обнаруживают по изменению окраски добавляемого к раствору дрожжей акцептора водорода – метиленового синего, который при восстановлении обесцвечивается.

Ход работы:

В 1-ю пробирку наливают 10 капель кипяченых дрожжей, во 2-ю – 10 капель некипяченых, добавляют по 10 капель 10% глюкозы и 1 капле метиленового синего (акцептор), закрывают пробками, инкубируют при нагревании. Наблюдают изменение окраски (просветление до обесцвечивания) в одной из пробирок.

Оформление работы

Указывают принципы методов, регистрируют результаты и делают выводы о проявлении активности ферментов разных классов, поясняя особенности реакций (донорно-акцепторные отношения – I класс, атакуемые связи – III класс).

Вопросы для самоконтроля

1. Сходство и различия неорганических катализаторов и ферментативных катализаторов. Природа биологического катализа: энзимы и рибозимы.
2. Природа, структурно-функциональная организация и роль простых и сложных ферментов.
3. Классификация и роль кофакторов (коферментов и простетических групп).
4. Механизм действия и свойства ферментов. Ферментативный катализ.
5. Регуляция действия ферментов.
6. Современная номенклатура и классификация ферментов.
7. Принципы количественного определения активности ферментов. Единицы измерения активности ферментов.
8. Практическое использование ферментов и их ингибиторов в медицине.

ТЕМА 4. СТРОЕНИЕ, СВОЙСТВА И ФУНКЦИИ ВИТАМИНОВ

Актуальность

Витамины – низкомолекулярные органические вещества различной химической природы, регуляторы обменных процессов и жизнедеятельности организма. В организме не синтезируются и являются незаменимыми пищевыми факторами. Биологическая роль витаминов связана с регуляцией обменных процессов в организме, поскольку многие из них входят в состав коферментов (простетических групп) ферментов. При недостаточном поступлении витаминов в организм развиваются тяжелые заболевания – авитаминозы. Теоретические сведения о витаминах, а также практические навыки качественного и количественного определения этих веществ в различных биологических объектах нужны врачу для профилактики, диагностики и лечения гипо- и авитаминозов.

Цель

1. Изучить свойства, химическую структуру, классификацию, биологическую роль и источники витаминов и витаминоподобных веществ, клиническую картину гипер- и гиповитаминозов.
2. Научиться проводить качественные реакции с растворами витаминов.
3. Использовать полученные навыки для обнаружения водо- и жирорастворимых витаминов в биологических объектах.

Вопросы для самоподготовки

1. Понятие о витаминах. Признаки витаминов и витаминоподобных веществ, сходство и отличия.
2. Классификация и номенклатура витаминов. Единицы активности.
3. Разнообразие химических структур витаминов. Свойства витаминов.
4. Роль витаминов в метаболизме (коферменты, антиоксиданты и др.), способы регуляции обменных процессов витаминами.
5. Значение витаминов в питании, суточная потребность, возможности синтеза в организме.
6. Понятие о провитаминах. Примеры превращения провитаминов в витамины.
7. Понятие об антивитаминах. Примеры использования антивитаминов в качестве лекарственных средств.
8. Степени обеспеченности организма витаминами и влияющие факторы. Гипо- и авитаминозы (экзо- и эндогенные). Гипервитаминозы.
9. Характеристика отдельных жирорастворимых и водорастворимых витаминов. Их строение, активный центр и биологическая роль.
10. Лекарственные формы жиро- и водорастворимых витаминов.

Самостоятельная работа

Заполнить таблицу витаминов и витаминоподобных веществ (приложение 2): названия, формула, источники, суточные нормы потребления, функции в организме, проявления гипо- и гипервитаминозов (если есть).

Лабораторная работа 1

Реакции на жирорастворимые витамины

Реактивы

1) Серная кислота концентрированная, 2) хлороформ, 3) уксусный ангидрид, 4) азотная кислота концентрированная, 5) 0,025% раствор цистеина, 6) 10% раствор NaOH.

РЕАКЦИЯ НА РЕТИНОЛ (ВИТАМИН А)

Принцип

Метод основан на способности концентрированной серной кислоты отнимать воду от ретинола с образованием окрашенных продуктов.

Материал для исследования

Витамин А (0,05% масляной раствор).

Проведение анализа

В пробирку вносят 2 капли раствора витамина А, 5 капель хлороформа и 1-2 капли концентрированной серной кислоты. Появляется синее окрашивание, очень быстро переходящее сначала в фиолетовое, затем в красно-бурое (окраска развивается до тёмного, почти чёрного цвета).

РЕАКЦИЯ НА КАЛЬЦИФЕРОЛ (ВИТАМИН D)

Принцип

Витамины группы D и их провитамины в присутствии серной кислоты и уксусного ангидрида теряют молекулу воды, превращаясь в продукт холестерилена сине-фиолетового и зелёного цвета.

Материал для исследования

Витамин D (масляной раствор).

Проведение анализа

В пробирку вносят 3 капли раствора витамина D, 5 капель хлороформа, добавляют 3 капли уксусного ангидрида и 3 капли концентрированной серной кислоты. Развивается красное окрашивание, быстро переходящее в фиолетовое, синее и далее в зелёное. Если объекты имеют примеси холестерина, то зелёная окраска переходит в красную.

РЕАКЦИЯ НА ТОКОФЕРОЛ (ВИТАМИН E)

Принцип

При взаимодействии токоферола с концентрированной азотной кислотой образуется красное или желтовато-красное соединение хиноидной структуры.

Материал для исследования

Витамин E (0,1% спиртовой раствор).

Проведение анализа

В сухую пробирку вносят 2 капли раствора витамина E и добавляют 10 капель концентрированной азотной кислоты. Пробирку встряхивают и наблюдают

появление красного окрашивания. Для ускорения реакции пробирку можно поместить на 3 мин в кипящую водяную баню.

РЕАКЦИЯ НА ВИКАСОЛ (СИНТЕТИЧЕСКИЙ АНАЛОГ ВИТАМИНА К1)

Принцип

Викасол в присутствии цистеина в щелочной среде окрашивается в лимонно-жёлтый цвет.

Материал для исследования

Викасол (0,05% раствор).

Проведение анализа

К 5 каплям викасола добавляют 5 капель раствора цистеина и 1 каплю NaOH. Развивается лимонно-жёлтое окрашивание.

Оформление работы

Указывают принципы методов, регистрируют результаты в виде таблицы и делают вывод о наличии витаминов в исследуемом материале.

Название исследуемого витамина	Наблюдаемое окрашивание	Вывод о наличии/отсутствии витамина
Ретинол (витамин А)		
Кальциферол (витамин D)		
Токоферол (витамин E)		
Викасол (аналог витамина К)		

Лабораторная работа 2 **Реакции на водорастворимые витамины**

Реактивы:

1) 10% раствор NaOH, 2) конц. HCl, 3) 1% раствор FeCl₃, 4) 10% раствор CH₃COOH, 10% раствор тиомочевины, 6) 5% раствор Cu(CH₃COO)₂, 7) изобутиловый спирт, 8) цинк металлический, 9) 5% раствор калия гексацианоферрата K₃Fe(CN)₆, 10) порошок гидросульфита натрия, 11) 0,1% 2,6-дихлорфенолиндофенол (ДХФИФ, краска Тильманса), 12) 2% и 10% растворы HCl, 13) 10% раствор Na₂CO₃, 14) 0,01% раствор метиленового синего.

Оборудование

Электроплитка, беззольные фильтры, ртутно-кварцевая лампа.

Материал для исследования

Порошок тиамин (5% раствор тиамин бромид), порошок рибофлавина (0,025% раствор рибофлавина перед употреблением разводят в 5 раз; из 0,1% раствора рибофлавиннуклеотида в ампулах готовят 0,002% раствор; флавионат в ампулах содержит 0,002% раствор ФАД), порошок никотинамида (никотиновой кислоты), 1% раствор витамина B₆ (или 5% раствор пиридоксина гидрохлорида), витамин B₁₂ (раствор цианокобаламина), 1% раствор аскорбата.

РЕАКЦИЯ НА ТИАМИН (ВИТАМИН В₁)

Принцип

Железосинеродистый калий в щелочной среде окисляет тиамин в тиохром, интенсивно флуоресцирующий синим светом в ультрафиолете.

Проведение анализа

К 1–2 каплям раствора или 1–2 мг порошка тиамина прибавляют 5–10 капель раствора NaOH и 2 капли раствора $K_3[Fe(CN)_6]$, перемешивают, нагревают на спиртовке, наблюдают флуоресценцию в лучах ртутно-кварцевой лампы.

РЕАКЦИИ НА РИБОФЛАВИН (ВИТАМИН В₂)

1) Реакция восстановления

Принцип

Метод основан на восстановлении рибофлавина водородом, выделяющимся при добавлении металлического цинка к концентрированной HCl. Вначале образуется промежуточный продукт родофлавин розового цвета, а затем постепенно бесцветная лейкоформа.

Проведение анализа

Берут 0,025% раствор рибофлавина, к 10 каплям раствора витамина В₂ добавляют 5 капель концентрированной соляной кислоты и гранулу металлического цинка. Жидкость постепенно окрашивается в розовый цвет, затем обесцвечивается. Дополнительно сравнивают обе получаемых формы витамина В₂ (родофлавин розового цвета и бесцветную лейкоформу) по степени флуоресценции в ультрафиолетовом свете.

2) Реакция флуоресценции

Рибофлавин обладает окислительно-восстановительными свойствами, поскольку в структуре изоаллоксазинового кольца имеет двойные связи, по месту разрыва которых к атомам азота могут присоединяться 2 протона и 2 электрона, поступающие от окисляемого субстрата.

Принцип

Метод основан на способности окисленных форм рибофлавина и флавиновых коферментов в ультрафиолетовом свете давать жёлто-зелёную флуоресценцию, интенсивность которой зависит от их концентрации. Восстановленные формы флавинов не флуоресцируют.

Проведение анализа

В 1-ю пробирку вносят 10 капель рибофлавина, во 2-ю – 10 капель рибофлавиномононуклеотида, в 3-ю – 10 капель флавината. Приливают в каждую пробирку по 5 мл дистиллированной воды, перемешивают, добавляют в каждую на кончике скальпеля порошок натрия гидросульфита (восстановитель) и наблюдают за гашением флуоресценции.

РЕАКЦИЯ НА НИКОТИНОВУЮ КИСЛОТУ (ВИТАМИН В₅)

Принцип

При нагревании витамина РР с раствором уксуснокислой меди образуется плохо растворимый осадок медной соли никотиновой кислоты синего цвета.

Проведение анализа

5–10 мг никотиновой кислоты (никотинамида) помещают в пробирку с 10 каплями 10% раствора CH_3COOH и растворяют при нагревании. К нагретому до кипения раствору добавляют равный объём 5% раствора $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, жидкость мутнеет. При стоянии и постепенном охлаждении раствора выпадает осадок медной соли никотиновой кислоты синего цвета.

РЕАКЦИЯ НА ПИРИДОКСИН (ВИТАМИН В₆)

Принцип

Витамин В₆ в реакции с FeCl_3 образует комплексную соль красного цвета по типу фенолята железа.

Проведение анализа

К 5 каплям раствора витамина В₆ добавляют 5 капель раствора FeCl_3 . Развивается красное окрашивание.

РЕАКЦИЯ НА КОБАЛАМИН (ВИТАМИН В₁₂)

Принцип

Взаимодействие содержащихся в витамине ионов кобальта с тиомочевинной при нагревании приводит к образованию роданида кобальта зелёного цвета.

Проведение анализа

Приготовление минерализата: в пробирку вносят 5 капель раствора витамина В₁₂, 5 капель конц. H_2SO_4 и сжигают (минерализуют), нагревая под тягой. Пробирку осторожно охлаждают под проточной водой и добавляют 1 мл воды.

Проведение реакции: на беззольный фильтр наносят 2–3 капли тиомочевины, высушивают над плиткой. Поверх высохшего пятна на фильтр наносят 1–2 капли минерализата и вновь нагревают над плиткой до высыхания. На фильтре по краям пятна появляется сине-зеленое окрашивание, свидетельствующее о наличии кобальта.

РЕАКЦИИ НА АСКОРБИНОВУЮ КИСЛОТУ (ВИТАМИН С)

Принцип

Аскорбиновая кислота обладает восстанавливающими свойствами и может восстанавливать 2,6-дихлорфенолиндофенол (2,6-ДХФИФ), метиленовый синий, калия гексацианоферрат ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$), окисляясь при этом до дегидроаскорбата. ДХФИФ и метиленовый синий восстанавливаются до бесцветных лейкосоединений, а $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ восстанавливается до $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, дающего в реакции с ионами трехвалентного железа соль $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ сине-зелёного цвета.

Проведение анализа

1) Реакция с 2,6-дихлорфенолиндофенолом

В пробирку вносят 10 капель раствора 2,6-ДХФИФ, 1–2 капли 10% раствора HCl и 1% раствор витамина С (по каплям) до обесцвечивания 2,6-ДХФИФ.

2) Реакция с метиленовым синим

В две пробирки вносят по капле метиленового синего. В 1-ю пробирку прибавляют 5 капель раствора аскорбиновой кислоты, во 2-ю – 5 капель дистил-

лированной воды и ставят в водяную баню. Через некоторое время в пробирке с витамином жидкость обесцвечивается.

3) Реакция с калия гексацианоферратом

К 10 каплям аскорбиновой кислоты прибавляют 10 капель раствора $K_3Fe(CN)_6$ и 5 капель раствора $FeCl_3$. Наблюдают образование сине-зелёного окрашивания (берлинская лазурь).

Практическое значение

Качественные реакции на витамины позволяют установить подлинность (достоверность) витаминных лекарственных препаратов, также реакции можно использовать для обнаружения и количественного определения витаминов в пищевых объектах и лекарственных растениях.

Оформление работы

Указывают принципы используемых методов, регистрируют полученные результаты в виде приведённой таблицы, делают вывод о наличии/отсутствии каждого из изучаемых водорастворимых витаминов в исследуемом материале.

Название исследуемого витамина		Окраска	Вывод
B ₁	Тиамин		
B ₂	Рибофлавин	реакция восстановления	
		реакция окисления	
	ФМН (рибофлавиннуклеотид)		
	ФАД (флавинат)		
B ₅	Никотинамид		
B ₆	Пиридоксин		
B ₁₂	Кобаламин		
C	Дигидро-аскорбат	реакция с 2,6-ДХФИФ	
		реакция с метиленовым синим	
		реакция с $K_3Fe(CN)_6$	

Вопросы для самоконтроля

1. Строение жирорастворимых витаминов А, Е, D, их активные формы.
2. Строение водорастворимых витаминов с указанием активного центра (B₁, B₂, B₆, PP, C, H), их активные формы (ТДФ, ФМН, ФАД, ПФ, НАД⁺, НАДФ⁺).
3. Представление о химическом строении водорастворимых витаминов B₃, B₁₂, B₉(B_C), их активных форм, жирорастворимых витаминов К, F и коэнзима Q.
4. Классификация и номенклатура витаминов, единицы активности. Про- и антивитамины, витаминopodobные вещества.
5. Витамины в питании. Факторы, влияющие на обеспеченность организма витаминами. Депонирование и выведение витаминов.
6. Характеристика отдельных жиро- и водорастворимых витаминов, витаминopodobных веществ, их биологическая роль, клиническая картина авитаминозов (гипервитаминозов, если есть), суточная потребность, источники.
7. Витамины и антивитамины как лекарственные вещества.

Тестовые задания

Выбрать правильные ответы.

1. АКТИВНЫМ ЦЕНТРОМ ФЕРМЕНТА НАЗЫВАЮТ

- 1) участок фермента, обеспечивающий присоединение субстрата и его превращение
- 2) место присоединения апофермента к коферменту
- 3) часть фермента, которая легко отщепляется от апофермента
- 4) место присоединения аллостерического эффектора

2. В ФОРМИРОВАНИИ СУБСТРАТ-ЭНЗИМНОГО КОМПЛЕКСА УЧАСТВУЮТ СВЯЗИ

- 1) водородные
- 2) пептидные
- 3) ионные
- 4) дисульфидные

3. ФЕРМЕНТ ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С

- 1) апоферментом
- 2) коферментом
- 3) субстратом
- 4) холоферментом

4. СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТА ОПРЕДЕЛЯЕТСЯ

- 1) апоферментом
- 2) коферментом
- 3) протетической группой
- 4) проферментом

5. ЧАСТЬЮ ФЕРМЕНТА, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩЕЙ ХИМИЧЕСКОЕ ПРЕВРАЩЕНИЕ, ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) адсорбционный центр
- 2) регуляторный центр
- 3) каталитический центр
- 4) контактный центр

6. СОГЛАСНО ТЕОРИИ ФИШЕРА

- 1) активный центр фермента и субстрат находятся в строгом пространственном соответствии
- 2) активный центр пространственно формируется по субстрату в процессе образования субстрат-энзимного комплекса
- 3) активный центр присоединяет группу родственных субстратов

7. СОГЛАСНО ТЕОРИИ КОШЛАНДА

- 1) активный центр фермента и субстрат находятся в строгом пространственном соответствии

- 2) активный центр пространственно формируется по субстрату в процессе образования субстрат-энзимного комплекса
- 3) активный центр присоединяет группу родственных субстратов
- 4) активный центр может взаимодействовать только с одним субстратом

8. ВИТАМИНЫ В СОСТАВЕ ФЕРМЕНТА ЯВЛЯЮТСЯ

- 1) источником энергии
- 2) структурными компонентами клеток
- 3) коферментами

9. ОСНОВНОЙ ФУНКЦИЕЙ КОФЕРМЕНТА НАД⁺, ВХОДЯЩЕГО В СОСТАВ АКТИВНОГО ЦЕНТРА, ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) дегидрирование
- 2) декарбоксилирование
- 3) ацетилирование
- 4) окислительное декарбоксилирование

10. ОСНОВНОЙ ФУНКЦИЕЙ КОФЕРМЕНТНОЙ ФОРМЫ ВИТАМИНА В₁ ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) участие в процессах дезаминирования
- 2) участие в процессах окисления
- 3) перенос ацильных групп
- 4) участие в окислительном декарбоксилировании кетокислот

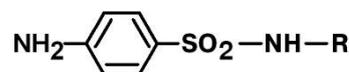
Ситуационные задачи

1. Липаза – фермент жировой ткани, обеспечивающий расщепление депонированных нейтральных жиров, может находиться в двух формах с различной активностью: в виде простого белка и в виде фосфопротеина.

Объяснить, почему переход одной формы в другую сопровождается изменением активности. Предположить, в каком состоянии липаза активна, если известно, что выделяющийся при физической нагрузке гормон адреналин запускает в клетке каскад реакций, ведущих к фосфорилированию белков.

2. В качестве антибактериальных средств широкого спектра действия используют сульфаниламиды, содержащие структуру, схожую с парааминобензойной кислотой.

Указать, на чём основано использование сульфаниламидов и что ещё обычно рекомендуют принимать на фоне применения сульфаниламидов для лечения заболеваний.



сульфаниламиды

БЕЛКИ. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ. ФЕРМЕНТЫ. ВИТАМИНЫ. (КОНТРОЛЬ ПО ТЕМАМ 1-4)

Вопросы для самоподготовки

Белки. Нуклеиновые кислоты

1. Понятие о белках. Биологическая роль белков.
2. Аминокислотный состав белков. Строение 20 природных аминокислот, классификация по строению радикала. Функциональные группы аминокислот, их роль. Заменяемые и незаменимые аминокислоты.
3. Индивидуальная роль аминокислот вне состава белков. Аминокислоты – лекарственные препараты.
4. Физико-химические свойства белков, очистка и разделение, виды осаждения. Высаливание, его механизм, практическое значение. Необратимое осаждение белков, агенты и механизмы, использование в биохимии и медицине.
5. Уровни структурной организации белковой молекулы. Типы связей, стабилизирующих структуру белковой молекулы. Денатурация и ренатурация белков, условия, шапероны.
6. Составить и назвать пептид, определить суммарный заряд, растворимость, зону рН с изоэлектрической точкой, движение в электрическом поле.
7. Классификация белков по функциям (примеры).
8. Классификация белков по строению. Белки простые и сложные.
9. Представление о структуре и биологической роли фосфо-, глико-, липо-, металло-, хромопротеинов (гемо-, флаво- и ретиналь-протеинов).
10. Нуклеопротеины, структуры белковой и небелковой частей. Особенности строения гистонов и протаминов, роль в стабилизации нуклеиновых кислот.
11. Структурные формулы азотистых оснований. Нуклеозиды. Классификация, структура нуклеотидов, представленных в нуклеиновых кислотах.
12. Понятие о нуклеотидах, отличных от нуклеотидов нуклеиновых кислот. Роль отдельных мононуклеотидов и динуклеотидов (участие в активации молекул, детоксикации эндогенных метаболитов и ксенобиотиков, механизмах катализа, регуляции, энергетических процессах). Строение и роль циклических нуклеотидов.
13. Биологические и метаболические взаимосвязи аминокислот и нуклеиновых кислот. Информация о белке. Аминокислоты – источники синтеза и конечные продукты распада нуклеотидов. Мочевая кислота как конечный продукт обмена пуринов.
14. Виды нуклеиновых кислот, локализация в клетке, биологическая роль, сходство и различия их первичной и вторичной структур.
15. Типы РНК, их локализация, функции, особенности строения, уровни организации, стабилизирующие связи.
16. ДНК: физико-химические свойства, состав, уровни организации, стабилизирующие связи, биологическая роль. ДНК прокариот, эукариот, ядра, митохондрий.

Ферменты. Витамины

1. Понятие о ферментах. История изучения энзимологии.
2. Химическая природа ферментов. Сходство и различия между ферментами и неферментными катализаторами.
3. Проферменты, изоферменты, множественные формы фермента.
4. Структурно-функциональная организация ферментов: уровень структуры, простые и сложные ферменты, холофермент, роль апофермента и кофактора (кофермента, простетической группы) в катализе, активный и аллостерический центры.
5. Кинетика ферментативных процессов. Механизмы катализа: ковалентный, кислотно-основной и другие.
6. Свойства ферментов: специфичность, влияние $t^{\circ}\text{C}$, pH среды, количества субстрата; активация и ингибирование, типы и обратимость ингибирования.
7. Регуляция активности ферментов: аллостерические механизмы, фосфорилирование и дефосфорилирование, частичный протеолиз, белок-белковые взаимодействия, компартментализация и др.
8. Принципы современной номенклатуры и классификации ферментов. Характеристика ферментов по схеме: класс, основные подклассы, строение, коферменты, катализируемая реакция, биологическая роль.
9. Принципы определения активности ферментов, единицы активности.
10. Использование ферментов в медицине: энзимодиагностика, энзимопатология, энзимотерапия (ферменты и ингибиторы ферментов). Значение определения изоферментов в клинической практике.
11. Признаки витаминов и витаминоподобных веществ. Учёные – основоположники витаминологии. Классификация и номенклатура витаминов.
12. Гипо- и авитаминоз экзо- и эндогенный. Гипервитаминоз.
13. Провитамины и антивитамины (примеры).
14. Строение витаминов А, D₃, Е, С, Н, В₁, В₂, В₆, РР, активные центры, коферментная роль биологически активных форм (ФМН/ФАД, НАД⁺/НАДФ⁺, ПФ, ТДФ и др.). Представления о строении, роли витаминов К, F, В₃, В₁₂, В_С.
15. Характеристика витаминов по плану: 1) химическая структура, активная форма; 2) источники, образование из провитамина; 3) суточная потребность; 4) биологическая роль; 5) недостаточность, гипервитаминоз (если есть).
16. Витамины – лекарственные препараты.

Практическая часть

1. Исследование белка и свободных аминокислот в биологическом материале.
2. Исследование высаливания и денатурации белков.
3. Выделение и анализ компонентов фосфо-, глико-, нуклеопротеинов.
4. Обнаружение небелкового компонента гемопротеинов, мочевой кислоты.
5. Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры.
6. Влияние активаторов и ингибиторов на активность амилазы.
7. Оценка специфичности действия уреазы.
8. Определение активности фермента. Единицы активности ферментов.
9. Оценка работы ферментов разных классов.

ТЕМА 5. ОБМЕН ВЕЩЕСТВ И ЭНЕРГИИ. БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ В ОБМЕН ВЕЩЕСТВ И ЭНЕРГИИ. ОБЩИЕ ПУТИ КАТАБОЛИЗМА И ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ (СЕМИНАР)

Актуальность

Биологическое окисление протекает во всех живых клетках организма в виде совокупных окислительных реакций. Основной функцией процесса является обеспечение организма энергией для процессов жизнедеятельности. Основной формой энергии, доступной для использования, является аденозинтрифосфорная кислота (АТФ). Синонимом биологического окисления является тканевое дыхание. Биологическое окисление протекает многостадийно с участием промежуточных ферментативных реакций. Происходит многократная передача протонов и электронов или только электронов от донора к акцептору. Конечным акцептором электронов и протонов служит $\frac{1}{2}O_2$. Конечными продуктами тканевого дыхания являются H_2O и CO_2 . Процесс фосфорилирования, сопряжённый с тканевым дыханием, называется окислительным фосфорилированием. Чрезвычайно важной функцией цепи дыхательных ферментов митохондрий наряду с передачей электронов является аккумуляция части освобождающейся энергии в фосфатных связях макроэргических соединений. В организме существуют альтернативные биологическому окислению пути использования O_2 .

Цель

1. Изучить роль кислорода в организме, пути его использования.
2. Ознакомиться с процессами биологического окисления и конечными продуктами тканевого дыхания.
3. Изучить механизмы окислительных реакций в клетке и строение основных коферментов тканевого дыхания.
4. Изучить механизмы окислительного фосфорилирования и пути образования макроэргов с количественной оценкой образования АТФ в ходе тканевого дыхания, сопряженного с окислительным фосфорилированием.

Вопросы для самоподготовки

1. Понятие об обмене веществ. Пластическая и энергетическая роль метаболизма.
2. Взаимосвязь катаболизма и анаболизма, энергетика и субстраты процессов.
3. Этапы катаболизма. Стадии катаболических превращений питательных веществ в организме, связанные с высвобождением свободной энергии.
4. Формы трансформации свободной энергии – образование восстановленных эквивалентов (НАДФН·Н) и синтез макроэргических соединений (АТФ, 1,3-дифосфоглицерат, креатинфосфат, ацетил~SКоА и др.).
5. Строение мультиферментного пируватдегидрогеназного комплекса, фермен-

ты, роль коферментов и работа их активных центров. Механизм окислительного декарбоксилирования пирувата.

6. Ацетил~КоА – ключевая фигура метаболизма.
7. Цикл трикарбоновых кислот (ЦТК, цикл Кребса) – универсальный механизм окисления. Взаимосвязи ЦТК с распадом углеводов, липидов, белков.
8. Цикл Кребса: химические реакции, дегидрогеназы и их коферменты, механизм субстратного фосфорилирования, биологическая роль ЦТК.
9. Циклы АТФ–АДФ, НАДФН·Н–НАДФ⁺. Свойства молекул АТФ и НАДФН. АТФ – универсальный источник и переносчик химической энергии клетки.
10. Понятие о тканевом дыхании (биологическом окислении) и локализации ферментов тканевого дыхания на внутренней мембране митохондрий.
11. Совокупность процессов тканевого дыхания. Субстраты окисления.
12. Роль кислорода как конечного акцептора протонов и электронов восстановленных субстратов биологического окисления.
13. Строение внутренней мембраны митохондрий и компонентов дыхательной цепи. Последовательность компонентов цепи переноса электронов. Молекулярная организация ферментных ансамблей, роль коферментов. ФМН, FeS-белки, коэнзим Q, гемовые группы цитохромов.
14. Энергетическая лестница компонентов дыхательной цепи. Изменение свободной энергии в процессе переноса электронов, энергетические перепады и образование АТФ.
15. Трансмембранный перенос H⁺, механизм окислительного фосфорилирования. Представление о протонной АТФ-синтазе, транслоказах АТФ и АДФ.
16. Коэффициент P/O и метод его вычисления.
17. Сходство и отличия субстратного и окислительного фосфорилирования.
18. Возможности регуляции сопряжения окисления и фосфорилирования, физиологическое значение.
19. Причины разобщения дыхания и фосфорилирования, примеры действия разобщителей. Блокаторы тканевого дыхания.
20. Пути участия кислорода в метаболизме.
21. Неполное восстановление кислорода до воды, образование активных форм кислорода. Значение НАДФН как метаболической восстановительной энергии. Влияние на процессы метаболизма.
22. Понятие о микросомальном окислении, свободно-радикальном перекисном окислении макромолекул и системе антиоксидантной защиты. Суть альтернативности процессов биологического окисления и перекисного окисления.

Самостоятельная работа

Составить схему общих путей энергетического обмена в ходе изучения раздела 5. На схеме представить химизм и взаимосвязи пируватдегидрогеназного комплекса и цикла трикарбоновых кислот с энергетической цепью внутренней мембраны митохондрий. Приложить к схеме суммарные реакции показанных путей обмена, энергетическую лестницу, указать значение митохондриального потенциала.

Тестовые задания

Выбрать правильные ответы.

1. В СОСТАВЕ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ ОТСУТСТВУЮТ
 - 1) коэнзим Q и цитохром C
 - 2) цитохром B и цитохром C₁
 - 3) сукцинатдегидрогеназа и НАДН-дегидрогеназа
 - 4) цитохромы A и A₃

2. МЕХАНИЗМ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ ЗАКЛЮЧАЕТСЯ В
 - 1) транспорте протонов с наружной стороны внутренней мембраны митохондрии в матрикс
 - 2) трансформации энергии разности окислительно-восстановительных потенциалов в энергию электрхимического потенциала
 - 3) работе H⁺-АТФ-синтетазы
 - 4) работе цитохромов дыхательной цепи

3. ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ В ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ МИТОХОНДРИЙ ОБЕСПЕЧИВАЕТ ОБРАЗОВАНИЕ АТФ ЗА СЧЕТ
 - 1) энергии субстратов
 - 2) расхода кислорода
 - 3) сопряжения с переносом электронов по дыхательной цепи

4. КОНКУРЕНТНЫМИ ИНГИБИТОРАМИ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ЯВЛЯЮТСЯ
 - 1) малонат и оксалоацетат
 - 2) малат и оксалоацетат
 - 3) ацетил-КоА и фумарат
 - 4) оксалоацетат и α-кетоглутарат
 - 5) ацетоацетат и малонат

5. В ЦИКЛЕ КРЕБСА ДЕКАРБОКСИЛИРУЮТСЯ
 - 1) изоцитрат, α-кетоглутарат
 - 2) цитрат, сукцинил-КоА
 - 3) изоцитрат, оксалоацетат
 - 4) α-кетоглутарат, пируват

6. БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ЦТК ЗАКЛЮЧАЕТСЯ В ОБРАЗОВАНИИ
 - 1) ацетил-КоА как конечного продукта
 - 2) субстратов для цепи переноса электронов
 - 3) субстратов для реакций анаболизма
 - 4) СО₂ как конечного продукта метаболизма

7. ПРИ СНИЖЕНИИ КОНЦЕНТРАЦИИ КИСЛОРОДА В КЛЕТКЕ СКОРОСТЬ ЦТК ЗАМЕДЛЯЕТСЯ ВСЛЕДСТВИЕ

- 1) торможения активности аллостерических ферментов
- 2) повышения константы Михаэлиса для цитратсинтазы
- 3) снижения активности фумаразы и аконитазы
- 4) торможения окисления НАДН в дыхательной цепи

8. В ОТЛИЧИЕ ОТ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ, ОСТАЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТЫ ЦТК ЛОКАЛИЗОВАНЫ

- 1) в гиалоплазме
- 2) в лизосомах
- 3) в эндоплазматическом ретикулуме
- 4) в матриксе митохондрий
- 5) во внутренней мембране митохондрий

9. ВОССТАНОВЛЕННАЯ ФОРМА НАД ОБРАЗУЕТСЯ В РЕАКЦИЯХ ЦТК

- 1) сукцинатдегидрогеназной, α -кетоглутаратдегидрогеназной, малатдегидрогеназной
- 2) пируватдегидрогеназной, изоцитратдегидрогеназной, малатдегидрогеназной
- 3) малатдегидрогеназной, сукцинатдегидрогеназной, изоцитратдегидрогеназной
- 4) изоцитратдегидрогеназной, малатдегидрогеназной, α -кетоглутаратдегидрогеназной

10. ДЛЯ РЕГУЛЯЦИИ ОБЩЕГО ПУТИ КАТАБОЛИЗМА ХАРАКТЕРНО

- 1) ингибирование распада ацетил-КоА с помощью АТФ
- 2) отсутствие зависимости скорости цитратного цикла от концентрации кислорода
- 3) наличие лимитирующего фермента ЦТК-изоцитратдегидрогеназы
- 4) снижение скорости ЦТК ингибиторами тканевого дыхания

Ситуационные задачи

Ответы подробно и мотивированно объяснить.

1. Приём внутрь разобщающих агентов вызывает обильное потоотделение и повышение температуры тела. Дайте этому объяснение на молекулярном уровне.

Как изменяется соотношение Р/О в присутствии разобщающих агентов? Можно ли использовать разобщители для борьбы с ожирением?

2. Особая жировая ткань (бурый жир) имеется у новорождённых, а также у некоторых животных, впадающих в зимнюю спячку или приспособленных к обитанию в холодных регионах планеты. В митохондриях бурого жира выход АТФ на 1 атом поглощённого O_2 составляет менее 1 молекулы, в то время как в других тканях 2–3 молекулы.

Какая физиологическая функция может определяться таким низким отношением P/O в буром жире новорождённых? Каковы возможные механизмы, способные определять столь низкое отношение P/O, характерное для митохондрий бурого жира?

ТЕМЫ 6-7. СТРОЕНИЕ, ФУНКЦИИ, АНАЭРОБНЫЙ И АЭРОБНЫЙ ОБМЕН УГЛЕВОДОВ

1. СТРОЕНИЕ, ВНЕШНИЙ ОБМЕН, ДЕПОНИРОВАНИЕ УГЛЕВОДОВ

Актуальность

В организме человека и животных углеводы играют важную роль и выполняют разнообразные функции: служат источником энергии, обеспечивая до 67% суточного энергопотребления организма; являются пластическим материалом клеток и межклеточного вещества; используются в качестве исходных продуктов для синтеза липидов, белков и нуклеиновых кислот. Углеводные компоненты участвуют в поддержании иммунитета, в рецепции и клеточных контактах. Основным источником углеводов организма – различные пищевые продукты, главным образом, растительного происхождения. Суточная норма потребления углеводов 450–500 г. Поступающие в организм углеводы перевариваются в желудочно-кишечном тракте и всасываются в кровь в виде моносахаридов. В тканях часть глюкозы откладывается в виде гликогена. Особая роль в рационе питания принадлежит неперевариваемым и неусваиваемым полисахаридам, в первую очередь целлюлозе.

К заболеваниям, связанным с патологией углеводного обмена, относят сахарный диабет, гликогенозы, мукополисахаридозы, галактоземию, фруктоземию, наследственную непереносимость ряда углеводов.

Цель

1. Изучить переваривание и всасывание углеводов в пищеварительном тракте.
2. Изучить биосинтез и мобилизацию гликогена как энергетического резерва организма.
3. Практически оценить влияние пищеварительных ферментов на углеводы пищи.

Вопросы для самоподготовки

1. Структура основных представителей моно-, ди-, полисахаридов (рибоза, глюкоза, фруктоза, галактоза, мальтоза, лактоза, сахароза, крахмал, гликоген, целлюлоза, декстраны). Их происхождение, биологическая роль. Сходство и отличие структур крахмала, гликогена, целлюлозы. Гомо- и гетерополисахариды, роль гетерополисахаридов в организме.
2. Углеводы, поступающие в организм с пищей. Суточная потребность в углеводах.
3. Ферменты пищеварительных соков, участвующие в переваривании углеводов: класс, подкласс, локализация синтеза. Комплексы пристеночного пищеварения.
4. Реакции, катализируемые α -амилазой, конечной декстриназой, мальтазой, лактазой, сахаразой. Конечные продукты реакций.
5. Причины неперевариваемости целлюлозы в желудочно-кишечном тракте

человека. Роль целлюлозы в рационе питания.

6. Реакции синтеза и распада гликогена. Физиологическое значение и соотношение процессов в зависимости от ритма питания и режима работы мышц. Особенности обмена гликогена в печени и мышцах.
7. Аденилатциклазный механизм регуляции активности ферментов обмена гликогена. Влияние адреналина, глюкагона и инсулина на концентрацию цАМФ в клетке.
8. Участие ионов Ca^{2+} в регуляции активности ферментов обмена гликогена.
9. Биохимические основы наследственных нарушений переваривания углеводов и обмена гликогена (лактозная интолерантность, непереносимость сахарозы, гликогенозы и агликогенозы).

Самостоятельная работа

В ходе изучения раздела 6 дополнить схему энергетического обмена (составленную по разделу 5) до общей схемы углеводно-энергетического обмена. На данном этапе представить на схеме химизм и взаимосвязи гликогеногенеза и гликогенолиза, их выход на общие пути катаболизма (пируватдегидрогеназный комплекс и цикл трикарбоновых кислот с энергетической цепью внутренней мембраны митохондрий). Приложить к схеме суммарные реакции показанных путей обмена.

Лабораторная работа 1

Исследование влияния амилазы на крахмал и целлюлозу

Крахмал является гомополисахаридом, состоящим из α -амилозы и амилопектина. В α -амилозе остатки глюкозы связаны между собой α -(1,4)-гликозидными связями, в амилопектине – α -(1,4)-гликозидными и α -(1,6)-гликозидными связями. Целлюлоза является гомополисахаридом, в котором остатки глюкозы связаны между собой β -(1,4)-гликозидными связями. Фермент α -амилаза гидролизует только α -(1,4)-гликозидные связи.

Принцип

Ферменты, содержащиеся в биологических жидкостях, гидролизуют полисахариды. Появление продуктов переваривания полисахаридов определяют с помощью реакции Троммера, выявляющей у высвобождаемых при гидролизе сахаров (глюкозы, мальтозы) способность восстанавливать $\text{Cu}(\text{OH})_2$ голубого цвета в жёлтый CuOH и красный CuO при нагревании в щелочной среде.

Материал для исследования

Слюна (разведение 1:5).

Реактивы

- 1) Желудочный сок, 2) 5% раствор панкреатина, 3) 1% раствор крахмала, 4) 1% водная суспензия целлюлозы, 5) 1% раствор CuSO_4 ; 6) 10% раствор NaOH .

Проведение анализа

Готовят пробы соответственно таблице.

№ пробы	Крахмал, мл	Суспензия целлюлозы, мл	Слюна, мл	Желудочный сок, мл	Панкреатин, мл
1	1,0	-	1,0	-	-
2	1,0	-	-	1,0	-
3	1,0	-	1,0	1,0	-
4	1,0	-	-	-	2,0
5	-	1,0	1,0	-	-
6	-	1,0	-	1,0	-
7	-	1,0	1,0	1,0	-
8	-	1,0	-	-	2,0

Пробирки инкубируют 30 мин при 37°C в термостате (водяной бане). После инкубации проводят анализ на присутствие продуктов расщепления полисахарида с помощью реакции Троммера. В каждую из 8 пробирок добавляют по 1 мл раствора NaOH и по 5 капель раствора CuSO₄. Все пробирки ставят в кипящую водяную баню, кипятят 1 мин. Появление красного осадка оксида меди (I) указывает на положительную реакцию Троммера в присутствии глюкозы, мальтозы.

Оформление работы

Указывают принцип метода, итоги работы оформляют в виде таблицы:

№ проб	Субстрат	Источник фермента	Фермент	Результат

Делают вывод об особенностях переваривания крахмала и целлюлозы в пищеварительном тракте, объясняют особенности переваривания углеводов и указывают причины различий.

Лабораторная работа 2

Исследование влияния амилазы на крахмал и сахарозу

Реактивы

1) 1% раствор крахмала, 2) 1% раствор сахарозы, 3) рабочий реактив Фелинга (*ex tempore*): смешать по 10 капель реактивов Фелинг I, Фелинг II.

Материал для исследования

Слюна, разведение 1:10 (источник α -амилазы).

Принцип

Метод основан на сравнительном изучении способности фермента амилазы к гидролизу различных углеводных субстратов: полисахарида крахмала и дисахарида сахарозы. Действие фермента на субстрат выявляют при помощи качественной реакции на свободную альдегидную группу углеводов (реакция Фелинга). Крахмал и сахароза не имеют свободной альдегидной группы, поэтому не дают положительной реакции с реактивом Фелинга. Реакция может быть положительной (появление красно-оранжевой окраски) только в случае расщеп-

ления этих субстратов до мальтозы и глюкозы, которые имеют свободную альдегидную группу и обладают восстанавливающими свойствами.

Проведение реакции

В 1-ю пробирку добавляют 10 капель раствора крахмала, во 2-ю – 10 капель раствора сахарозы. Добавляют в каждую пробирку по 5 капель разбавленной слюны, перемешивают и ставят на 10 мин в водяную баню или термостат (37°C). Прodelывают с содержимым обеих пробирок реакцию Фелинга: к 5 каплям исследуемого раствора добавляют 3 капли рабочего реактива Фелинга (приготовленного самостоятельно в отдельной пробирке), пробы нагревают до кипения на водяной бане и кипятят 1 мин. Сравнивают окраску в пробирках.

Оформление работы

Указывают принцип метода, регистрируют результаты в таблице:

№ проб	Субстрат	Источник фермента	Фермент	Результат
1				
2				

Делают вывод о специфичности действия α -амилазы на субстрат, действию на сахарозу, указывают локализацию фермента в пищеварительном тракте.

Вопросы для самоконтроля

1. Классификация углеводов по структуре и функциям. Представители.
2. Переваривание, всасывание углеводов пищи. Ферменты полостного пищеварения, пристеночные комплексы ферментов. Роль целлюлозы в пищеварении.
3. Наследственная непереносимость углеводов, дефектные ферменты.
4. Реакции инверсии пищевых моносахаров в энтероците, гепатоците. Универсальность молекулы глюкозы.
5. Транспорт глюкозы через мембраны, глюкозные транспортеры, условия поступления в клетку, регуляция, способ депонирования.
6. Реакции путей синтеза и распада гликогена, энергетика процессов. Гормональная регуляция обмена гликогена. Особенности обмена гликогена в печени и мышцах. Гликогенозы, агликогеноз.

2. АНАЭРОБНЫЙ И АЭРОБНЫЙ ОБМЕН УГЛЕВОДОВ. НАРУШЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА УГЛЕВОДОВ

Актуальность

Гликолиз – центральный путь катаболизма глюкозы, может поставлять углеродный скелет для процессов биосинтеза. В анаэробных условиях гликолиз – единственный процесс в организме, поставляющий энергию. Именно благодаря гликолизу организм может осуществлять ряд физиологических функций в условиях гипоксии, платой за это становится накопление лактата. У некоторых анаэробных организмов, таких как дрожжи, а также в некоторых клетках высших организмов (например, эритроцит) анаэробное превращение углеводов является единственным источником АТФ. В аэробных условиях при отсутствии

НАДФН гликолиз не может быть завершён и становится начальной стадией расщепления энергетических субстратов (до промежуточного продукта – пирувата), которую продолжают реакции аэробного окисления до CO_2 , H_2O , сопряженные с образованием АТФ.

Аэробный распад глюкозы – основной путь её катаболизма у аэробных организмов, который поставляет гораздо больше энергии, чем анаэробный гликолиз. Промежуточные продукты окислительного распада глюкозы используются при синтезе аминокислот, липидов и других биомолекул. В наибольшей зависимости от аэробного распада глюкозы находится мозг. Он расходует около 100 г глюкозы в сутки. При голодании для организма очень важен процесс глюконеогенеза.

Существует и прямой аэробный путь превращения глюкозы – пентозофосфатный цикл, выполняющий анаболическую функцию поставки НАДФН для восстановительных синтезов и пентоз для синтеза нуклеотидов.

Цель

1. Проверить сравнительное изучение гликолиза, глюконеогенеза, гликогенолиза, спиртового брожения, а также этапов аэробного распада углеводов и пентозофосфатного пути.
2. Изучить регуляцию распада и синтеза глюкозы, гликогена, нарушения обмена углеводов.
3. Ознакомиться с методами оценки гликолиза по обнаружению лактата, оценки содержания глюкозы в крови и моче, построения гликемических кривых.

Вопросы для самоподготовки

1. Важнейшие пути превращения глюкозы в тканях, роль глюкозо-6-фосфата.
2. Гликолиз: локализация, реакции (обратимые и необратимые, сопряжённые с потреблением и синтезом АТФ), ферменты и метаболиты, суммарное уравнение, энергетический эффект. Суть субстратного фосфорилирования, роль.
3. Судьба восстановленного НАД⁺, образовавшегося при окислении глицеральдегид-3-фосфата. Гликолитическая оксиредукция: сущность и значение.
4. Гликогенолиз, ферменты, суммарное уравнение, энергоэффект окисления глюкозы при распаде гликогена и глюкозы, поступающей из кровотока, сходство и отличие от гликолиза. Гликогенолиз с целью повышения концентрации глюкозы в крови, его энергетический эффект, локализация.
5. Метаболизм фруктозы и галактозы. Основы фруктозурии и галактоземии.
6. Спиртовое брожение, суммарное уравнение, энергетический эффект, сходство и отличие от гликолиза. Влияние этанола на обмен углеводов, причины гиперлактатемии и гипогликемии при острой интоксикации.
7. Предшественники глюкозы в глюконеогенезе, специфические реакции, последовательность общих реакций, ферменты, локализация процесса. Суммарное уравнение. Расход энергии для синтеза 1 молекулы глюкозы.
8. Регуляторные ферменты гликолиза и глюконеогенеза, аллостерические эффекторы, влияние гормонов. Глюкозолактатный и глюкозоаланиновый циклы, значение при длительной физической работе и голодании.

9. Направления окислительного распада глюкозы, специфические и общие пути. Реакции аэробного распада: а) окисление до пирувата, б) окислительное декарбоксилирование пирувата, в) окисление ацетил~КоА в ЦТК. Указать ферменты, коферменты, акцепторы Н, локализацию, суммарное уравнение.
10. Переносчики водорода глюкозы в дыхательную цепь. Окислительное фосфорилирование, сходство и отличия с субстратным фосфорилированием.
11. Выход АТФ при аэробном и анаэробном распаде глюкозы, сходство и отличия. Роль глицерол-фосфатного, малат-аспартатного челночных механизмов. Роль аэробного распада глюкозы в мозге, эритроцитах, при работе мышц. Биохимический механизм эффекта Пастера.
12. Пентозофосфатный путь окисления глюкозы: локализация и роль, реакции окислительного этапа и смысл неокислительного, ферменты и коферменты, связь с гликолизом, понятие о метаболической восстановительной энергии.
13. Нервная и гормональная регуляция обмена углеводов. Инсулин и контринсулярные гормоны, их влияние на процессы превращения углеводов.
14. Содержание глюкозы в крови, источники. Гипо- и гипергликемии, причины. Нарушения обмена углеводов при сахарном диабете. Гликемические кривые, значение в диагностике, коэффициент Бодуэна. Гипоксия и обмен углеводов.

Самостоятельная работа

Дополнить схему углеводно-энергетического обмена. Для создания целостного представления об углеводно-энергетических потоках в организме представить на схеме химизм и взаимосвязи основных метаболических путей обмена глюкозы – гликолиз и глюконеогенез, пентозофосфатный цикл, их выход на общие пути катаболизма (ПДГ-комплекс, ЦТК и энергетическую цепь митохондрий).

Лабораторная работа 1

Обнаружение молочной кислоты в биологических пробах

Лактат является конечным продуктом гликолиза и гликогенолиза, протекающих в анаэробных условиях, которые возникают при мышечной нагрузке как физиологического, так и патологического характера (приступ эпилепсии, столбняк, тетания и другие судорожные состояния); гипоксии, связанной с сердечной и легочной недостаточностью; анемии и других нарушениях. При снижении кислотности желудочного сока (гипоацидный гастрит и другие заболевания) снижаются его бактерицидные свойства, поэтому анаэробная микрофлора, попадающая из полости рта в желудок, оказывается в оптимальных условиях и нарабатывает лактат в ходе молочно-кислого брожения углеводов пищи.

Принцип

Метод основан на реакции Уффельмана: при взаимодействии с лактатом комплексное соединение фенолята железа (III) фиолетового цвета превращается в малодиссоциирующую соль лактата железа с зеленовато-жёлтой окраской.

Реактивы

1) Фосфатно-соляной буфер, рН 7,2, 2) 1% раствор фенола, 3) 1% раствор FeCl₃, 4) 4% раствор молочной кислоты.

1) ОБНАРУЖЕНИЕ ЛАКТАТА В МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

Материал для исследования

Мышечная каша.

Проведение анализа

Готовят экстракт: кусочек мышцы тщательно растирают в ступке с 5,0 мл фосфатного буфера, полученную кашу фильтруют через 2 слоя марли.

Проводят цветную реакцию на лактат: сначала в пробирке готовят раствор фенолята железа, добавляя к 10 каплям раствора фенола 1–2 капли раствора $FeCl_3$ до появления фиолетовой окраски, затем к содержимому пробирки добавляют 3 капли экстракта мышц и наблюдают изменение окраски. В присутствии лактата фиолетовая окраска переходит в зеленовато-жёлтую вследствие образования лактата железа.

2) ОБНАРУЖЕНИЕ ЛАКТАТА В ЖЕЛУДОЧНОМ СОКЕ

Материал для исследования

Патологический и нормальный желудочный сок.

Проведение анализа

В пробирке готовят раствор фенолята железа из 2,0 мл раствора фенола и 3 капли раствора $FeCl_3$, смесь разливают поровну в 3 пробирки. Затем в 1-ю пробирку добавляют 1–2 капли раствора лактата (контроль), во 2-ю – патологический желудочный сок, в 3-ю – нормальный желудочный сок. В присутствии лактата фиолетовая окраска заменяется зеленовато-жёлтой, в нормальном желудочном соке фенолят железа обесцвечивается.

Оформление работы

Указывают принцип метода, регистрируют результаты в таблице, делают вывод: о путях снабжения мышцы кислородом, о присутствии молочной кислоты и причинах появления активности анаэробной микрофлоры в образце желудочного сока.

Исследуемая проба	Результат
Экстракт мышечной ткани	
Патологический желудочный сок	

Практическое значение

Наличие патологической кислотности (продуктов брожения: молочной, уксусной, масляной кислот) в желудочном соке указывает на сдвиг показателя кислотности от нормы в сторону повышения рН и появление в желудке анаэробных микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности.

Лабораторная работа 2

Определение содержания глюкозы в сыворотке крови

Благодаря наличию сложных механизмов регуляции, включающих центральную нервную, эндокринную системы и деятельность печени, содержание глюкозы в крови здорового человека довольно постоянно и колеблется от 3,3 до 5,8 ммоль/л. Значительные отклонения в сторону увеличения содержания глю-

kozy называют гипергликемией (гиперглюкоземией), в сторону уменьшения – гипогликемией (гипоглюкоземией). Для оценки содержания глюкозы в крови используют различные методы (редуктометрические, колориметрические, электрохимические, ферментативные), среди которых унифицированным является глюкозооксидазный. Метод специфичен, его можно использовать не только для оценки содержания глюкозы в плазме, сыворотке и цельной крови, но и в спинно-мозговой жидкости, транссудатах, экссудатах.

Принцип

Глюкоза с помощью фермента глюкозооксидазы окисляется до глюконовой кислоты с образованием пероксида водорода. Пероксид водорода в присутствии фермента пероксидазы окисляет краситель 4-аминоантипирин, превращая его в окрашенное соединение. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию глюкозы и определяется фотометрически.

Материал для исследования

Сыворотка крови.

Реактивы

- 1) Рабочий реагент (фенол, 4-амино-антипирин, глюкозооксидаза, пероксидаза в калиево-фосфатном буфере), 2) 5,55 ммоль/л раствор глюкозы (стандарт).

Проведение анализа

Готовят опытную и стандартную пробы согласно таблице.

	Опыт, мл	Стандарт, мл
Рабочий реагент	3,0	3,0
	Инкубируют 5 мин при 37°C.	
Сыворотка	0,01	-
Стандарт	-	0,01
	Инкубируют 15 мин при 37°C. Измеряют оптическую плотность проб при длине волны 510–530 нм в кювете 1 см против рабочего реагента.	

Расчёт

$$\text{Глюкоза [ммоль/л]} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}},$$

где: $E_{\text{оп}}$ – оптическая плотность пробы, $E_{\text{ст}}$ – оптическая плотность стандарта, $C_{\text{ст}}$ – концентрация стандартного раствора.

Нормальные величины

Цельная кровь	3,9–5,8 ммоль/л
Сыворотка крови	3,3–5,8 ммоль/л
Ликвор	2,75–3,85 ммоль/л

Оформление работы

Указывают принцип метода, регистрируют результаты анализа, выполняют расчёты. Сравнивают полученные данные с нормальными значениями. Делают заключение о наличии патологических отклонений.

Практическое значение

Увеличение концентрации глюкозы в сыворотке крови свыше 6,0 ммоль/л наблюдается как при физиологических, так и при патологических состояниях организма.

К *физиологической гипергликемии* относят алиментарную (одномоментный приём больших количеств легкоусвояемых углеводов) и нейрогенную (выброс в кровь больших концентраций катехоламинов при стрессовых ситуациях). Физиологическая гипергликемия носит транзиторный характер и достаточно быстро проходит.

Патологическая гипергликемия, как правило, обусловлена нейроэндокринными расстройствами с нарушением соотношения между секрецией гормонов гипогликемического и гипергликемического действия. Наиболее частой причиной становится сахарный диабет с абсолютной или относительной инсулиновой недостаточностью. Гипергликемия развивается при заболеваниях гипофиза с ростом секреции соматотропина и кортикотропина (акромегалия, болезнь Иценко–Кушинга, опухоли гипофиза и др.), опухолях мозгового слоя надпочечников с усиленным синтезом катехоламинов (феохромочитома) и коркового слоя надпочечников с усиленной продукцией глюкокортикоидов, гиперфункции щитовидной железы, поражениях диэнцефальной области, болезнях печени (инфекционный гепатит, цирроз).

Физиологическая гипогликемия: алиментарная при недостатке поступления углеводов с пищей и голодании, при усиленном образовании и выбросе в кровь инсулина (ответ на алиментарную гипергликемию) – развивается при некомпенсированном потреблении углеводов как источника энергии, или после тяжёлой и длительной мышечной работы. Может возникнуть в период лактации при усиленном поглощении глюкозы молочной железой.

Патологическая гипогликемия наблюдается при заболеваниях поджелудочной железы с гиперплазией β -клеток островков Лангерганса – гиперинсулинизм (инсулома, аденома, рак поджелудочной железы). Самая частая причина гипогликемии – передозировка инсулина. Причиной гипогликемии может стать снижение продукции гормонов-антагонистов инсулина при гипофункции коры надпочечников (Аддисонова болезнь, опухоли надпочечников), гипофункции и атрофии передней доли гипофиза (болезнь Симмондса), гипофункции щитовидной железы. Нейрогенная гипогликемия наблюдается при заболеваниях нервной системы (энцефалит, прогрессивный паралич и др.), психических заболеваниях (хронический алкоголизм, циклотимия и др.), травмах головного мозга. Гипогликемия может возникать при тяжёлых поражениях печени (отравления фосфором, хлороформом, острая желтая дистрофия печени, цирроз и др.), гликогенозах (болезнь Гирке) вследствие невозможности превращения гликогена в глюкозу. Гипогликемия при заболеваниях почек обусловлена потерей значительного количества глюкозы с мочой вследствие снижения почечного порога для глюкозы. Гипогликемия наблюдается при врожденных дефектах жирового и углеводного обмена в связи с неспособностью организма эффективно мобилизовать свои энергетические ресурсы.

Лабораторная работа 3

Влияние сахарной нагрузки на содержание глюкозы в крови (глюкозотолерантный тест)

Метод сахарной нагрузки (глюкозотолерантный тест (ГТТ) или тест на толерантность к глюкозе (ТТГ)) информативен для выявления скрытой формы сахарного диабета и нарушения гликогенообразовательной функции печени. При этом наиболее функциональным тестом является исследование постпрандиальной гипергликемии после пробного завтрака.

Принцип

Метод основан на определении содержания глюкозы в крови до нагрузки глюкозой и через 30, 60 и 120 мин после проведения нагрузки. Содержание глюкозы в крови определяют глюкозооксидазным методом (предыдущая лабораторная работа 2).

Материал для исследования

Образцы капиллярной крови, взятой до нагрузки глюкозой и через определённые промежутки времени после нагрузки.

Проведение анализа

В клинических лабораториях при проведении пробы с сахарной нагрузкой у обследуемого натошак берут кровь из пальца и определяют в ней содержание глюкозы. Затем дают раствор глюкозы или сахарозы из расчета 1,0–1,5 г сахара на 1 кг массы тела. Через 30, 60 и 120 мин после приёма сахара снова берут образцы крови и определяют содержание глюкозы.

На практическом занятии сахарную нагрузку изучают с готовыми образцами крови, взятыми до нагрузки глюкозой, через 30, 60 и 120 мин после неё.

Готовят стандартную и опытные пробы согласно таблице

	Пробы, мл				Стандарт, мл
	до нагрузки	время после нагрузки			
		30 мин	60 мин	120 мин	
	1	2	3	4	5
Рабочий раствор	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Кровь	0,01	0,01	0,01	0,01	-
Стандарт глюкозы	-	-	-	-	0,01
	Содержимое проб перемешивают, инкубируют 15 мин при 37°C, измеряют экстинкцию при длине волны 510–530 нм в кювете 0,5 см против рабочего раствора.				

Расчёт

$$\text{Глюкоза [ммоль/л]} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}},$$

где: $E_{\text{оп}}$ – оптическая плотность соответствующих опытных проб (до нагрузки, через 30, 60 и 120 минут после неё), $E_{\text{ст}}$ – оптическая плотность стандарта, $C_{\text{ст}}$ – концентрация стандартного раствора.

На основании полученных данных строят график – гликемическую (сахарную) кривую, откладывая по оси абсцисс время взятия крови, по оси ординат – содержание глюкозы в соответствующей пробе.

Нормальные величины

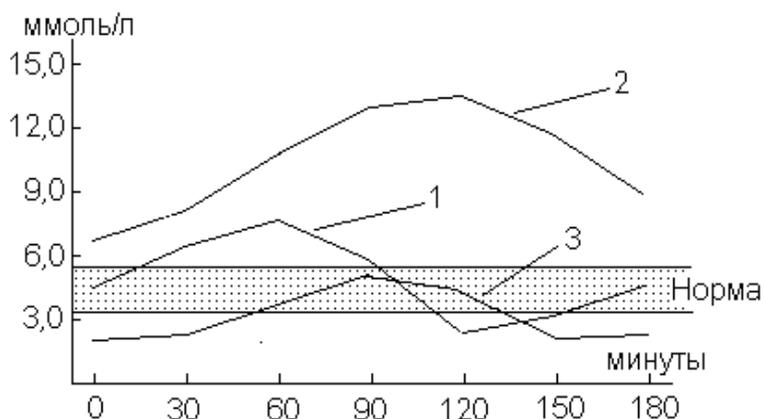
натощак	3,9–5,8 ммоль/л (100 %)
через 60 мин	6,7–9,4 ммоль/л (150–175%)
через 120 мин	ниже 6,7 ммоль/л

Практическое значение

Уровень глюкозы в крови у **здоровых лиц** после нагрузки глюкозой:

1. *Через 30–60 мин* после приема глюкозы наблюдается максимальное увеличение содержания глюкозы в крови: на 35–80% выше исходного. Повышение содержания глюкозы в течение 1-го часа после её приема объясняется переходом её в кровь и в значительной мере определяется быстротой всасывания, гликогенсинтезирующей функцией печени и всех прочих периферических органов.
2. *Через 90–120 мин* содержание глюкозы в крови возвращается к норме и иногда может быть даже ниже исходной величины. Уровень глюкозы в крови в этот период падает из-за усиленного выделения инсулина поджелудочной железой в ответ на развивающуюся гипергликемию, а глюкоза переходит в ткани. Инсулина выделяется больше, чем требуется для восстановления нормального уровня глюкозы в крови, что приводит к небольшой гипогликемии.
3. *К 150–180-й мин* содержание глюкозы в крови возвращается к исходному за счёт достижения равновесия всех систем регуляции уровня глюкозы в крови.

В клинической практике выделяют несколько типов гликемических кривых.



Типы гликемических кривых:

нормальная (1), гипергликемическая (2), гипогликемическая (3).

Параметры по содержанию глюкозы	Гликемические кривые		
	Нормальная	Гипергликемическая	Гипогликемическая
1. Исходный уровень	норма	гипергликемия	гипогликемия
2. Максимальный	1 ч	2–3 ч	Замедлен на 2–3 ч
3. Фаза гипогликемии	2 ч	нет	Резко выражена
4. Уровень к концу третьего часа	Исходный уровень	Исходного уровня не достигает	Исходного уровня не достигает

Гипергликемические кривые наблюдают при явных и скрытых формах сахарного диабета, повреждении паренхимы печени, гиперфункции щитовидной железы и коры надпочечников, тяжелых формах анемии, токсикозах, болезнях центральной нервной системы, инфекционных болезнях (ревматизм, сепсис, тиф, дизентерия, дифтерия, бронхопневмония), панкреатите, гликогеновой болезни.

Гипогликемические кривые наблюдают при аденоме островков Лангерганса, гипотиреозе, аддисоновой болезни, энцефалите, заболеваниях кишечника.

При скрытой форме сахарного диабета на фоне проведения ГТТ могут развиваться осложнения (гипергликемическая кома и др.). Во избежание этого при появлении первых симптомов заболевания рекомендовано вместо ГТТ выполнение теста толерантности к углеводам, в котором нагрузкой является углеводный завтрак. Кровь для исследования берут натощак и далее по той же схеме, что и при проведении глюкозотолерантного теста. Выявляется *постпрандиальная гликемия*. Такой тест является физиологичным, не требует присутствия на процедуре лечащего врача и рекомендован для широкого использования в лабораторной практике. В медицине этот тест часто называют оценкой «гликемического профиля» или тестом выявления постпрандиальной гликемии.

У здорового человека нагрузка глюкозой не вызывает глюкозурию.

Оформление работы

Заносят в таблицу полученные данные, строят гликемическую кривую, делают вывод о толерантности пациента к глюкозе, возможных причинах нарушения.

Метод определения	Концентрация глюкозы в крови, ммоль/л			
	до нагрузки	время после нагрузки		
		30 мин	60 мин	120 мин

Лабораторная работа 4

Экспресс-метод оценки содержания глюкозы в моче

Одной из причин глюкозурии является сахарный диабет, для его лечения нужно назначить такой режим питания и введения инсулина, чтобы в моче оставались лишь следы глюкозы, поэтому врач должен знать количество глюкозы, выделяемое больным с мочой в сутки.

Материал для исследования

Моча нормальная и патологическая (содержит глюкозу).

Реактивы

Набор диагностических полосок «Глюкотест» («Глюкофан», «Диафан», «Пентафан»).

Принцип

На конце полоски «Глюкотест» имеется полоса светло-жёлтого цвета, пропитанная растворами ферментов – глюкозооксидазы, пероксидазы и красителем. Глюкоза с помощью глюкозооксидазы окисляется кислородом воздуха до глюконовой кислоты с образованием пероксида водорода, который в присутствии пероксидазы окисляет краситель, превращая его в окрашенное соединение. Ин-

тенсивность окраски пропорциональна содержанию глюкозы и сравнивается с цветной шкалой из набора.

Подобные зоны индикации для определения глюкозы содержат экспресс-тесты «Биофан Г», «Глюкофан». Диагностические полоски могут иметь несколько зон индикаций, в том числе для глюкозы: «Диафан», «Тетрафан», «Пентафан» и др.

Проведение анализа

В пробирки с образцами нормальной и патологической мочи погружают полоски «Глюкотест», чтобы полоса с реактивами была смоченной. Быстро извлекают, кладут смоченным концом на пластмассовую пластину. Через 2 мин сравнивают окраску полоски с цветной шкалой набора «Глюкотест». Содержание глюкозы определяют по наиболее совпадающему со шкалой цвету полоски. Каждой полоске на шкале соответствует определенное содержание глюкозы.

Практическое значение

Метод обладает высокой субстратной специфичностью и позволяет обнаружить в моче глюкозу в пределах 0,055–1,11 ммоль/л. Простота и скорость выполнения анализа позволяют применять этот метод как предварительный тест при массовом обследовании. Тест позволяет самому больному следить за содержанием глюкозы в моче и соответственно изменять диету. Глюкозурия часто сопровождает гипергликемию, когда содержание глюкозы в крови выше почечного порога (9,9 ммоль/л). Глюкозурия бывает физиологическая – алиментарная, у беременных, нейрогенная при стрессах, а также патологическая – при нарушении обмена углеводов на фоне патологии поджелудочной железы (сахарный диабет, «бронзовый» (стероидный) диабет, острый панкреатит) и других нарушениях (тиреотоксикоз, акромегалия, гиперплазия коры надпочечников, инфаркт миокарда, кровоизлияния во внутренние органы, острые инфекции, нервные болезни, отравления морфином, фосфором). Глюкозурия на фоне нормогликемии – при повреждении канальцев почек (пиело- и гломерулонефриты, нефропатии, почечный диабет – семейная почечная глюкозурия, токсины).

Нормальные величины

Моча 0,06–0,93 ммоль/л.

Оформление работы

Указывают принцип метода, результаты заносят в таблицу, делают вывод о содержании глюкозы в моче, предполагают возможную патологию.

Исследуемый материал	Результат
Нормальная моча	
Патологическая моча	

Вопросы для самоконтроля

1. Пути использования углеводов в организме.
2. Реакции гликолиза, гликогенолиза и гликогеногенеза. Локализация и значение процессов. Спиртовое брожение.
3. Включение фруктозы и галактозы в процесс гликолиза.
4. Глюконеогенез, его субстраты, энергообеспечение, значение.

5. Этапы аэробного распада глюкозы: окисление до пирувата, окислительное декарбоксилирование пирувата, цикл Кребса и его сопряжение с дыхательной цепью митохондрий. Эффект Пастера.
6. Пентозофосфатный путь углеводов, связь с гликолизом, энергетика, роль.
7. Регуляция и нарушения углеводного обмена. Сахарный диабет, гипоксия.

Тестовые задания

Выбрать один правильный ответ.

1. К МОНОСАХАРИДАМ ОТНОСИТСЯ

- 1) сахароза
- 2) глюкоза
- 3) мальтоза
- 4) гликоген

2. К ДИСАХАРИДАМ ОТНОСИТСЯ

- 1) мальтоза
- 2) рибоза
- 3) эритроза
- 4) гликоген

3. К ПОЛИСАХАРИДАМ ОТНОСИТСЯ

- 1) гликоген
- 2) глюкоза
- 3) сахароза
- 4) лактоза

4. В РЕАКЦИЮ ОТКРЫТИЯ УГЛЕВОДОВ НЕ ВСТУПАЕТ

- 1) мальтоза
- 2) лактоза
- 3) сахароза
- 4) глюкоза

5. ПОЛИСАХАРИДОМ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) гликоген
- 2) целлюлоза
- 3) крахмал
- 4) амилопектин

6. ГЛИКОЗИДНЫМИ ТРАНСПОРТЁРАМИ ЯВЛЯЮТСЯ

- 1) липопротеины
- 2) хиломикроны
- 3) ГЛЮТ 1-5
- 4) Липиды

7. НАРУШЕНИЯ ПЕРЕВАРИВАНИЯ УГЛЕВОДОВ СВЯЗАНЫ С УГНЕТЕНИЕМ АКТИВНОСТИ

- 1) дисахаридаз
- 2) липаз
- 3) пепсина
- 4) каталазы

8. ПРИ ФОСФОРИЛИРОВАНИИ ГЛЮКОЗА ПРЕВРАЩАЕТСЯ В

- 1) глюкозо-6-фосфат
- 2) фруктозо-1-дифосфат
- 3) пируват
- 4) лактат

9. В СИНТЕЗЕ ГЛИКОГЕНА УЧАСТВУЕТ

- 1) глюкозо-6-фосфат
- 2) фруктозо-1-фосфат
- 3) рибоза
- 4) глюкоза

10. ГЛИКОГЕНОЛИЗ ВОЗМОЖЕН ПРИ АКТИВАЦИИ ФЕРМЕНТА

- 1) гесокиназы
- 2) глюкокиназы
- 3) фосфорилазы
- 4) пируват-киназы

Ситуационные задачи

Ответы подробно объяснить.

1. Ребёнку 7 лет необходимо определить сахар в крови для выявления сахарного диабета. Перед проведением пробы в лаборатории он очень волновался, плакал. В ходе анализа установлено, что у ребенка уровень сахара в крови выше нормы.
Пояснить, можно ли утверждать после такого исследования, что у ребёнка сахарный диабет.
2. Один спортсмен пробежал на соревнованиях дистанцию 100 м, другой – 5000 м.
Пояснить, у кого из них выше содержание молочной кислоты в крови и почему.
3. В костном мозге у больного, перенёвшего кровотечение, изменилось соотношение между пентозофосфатным и гликолитическим путями обмена углеводов.
Пояснить, как меняется соотношение и почему возникает такой сдвиг. Указать ферменты, активность которых целесообразно исследовать для проверки предположения.

ТЕМА 8. СТРОЕНИЕ, ФУНКЦИИ, ТРАНСПОРТ И ОБМЕН ЛИПИДОВ. НАРУШЕНИЕ МЕТАБОЛИЗМА ЛИПИДОВ

1. СТРОЕНИЕ, ФУНКЦИИ, ВНЕШНИЙ ОБМЕН, ДЕПОНИРОВАНИЕ ЛИПИДОВ

Актуальность

Липиды – низкомолекулярные органические вещества, разнообразны по химической структуре и функциям, нерастворимы в воде, но растворимы в органических растворителях. К липидам относят жирные кислоты (являются энергетическими субстратами), триацилглицерины (резервный энергетический материал), сложные липиды – фосфолипиды, гликолипиды, сфинголипиды (структурные компоненты клеточных мембран), стероиды – холестерол, один из главных представителей (предшественник желчных кислот, гормонов, витамина D, компонент клеточных мембран). Многообразие биологических функций определяет необходимость изучения липидов.

Цель

1. Изучить строение, свойства, биологическую роль липидов.
2. Изучить особенности переваривания, всасывания, транспорта и депонирования липидов.
3. Научиться определять качество пищевого жира, активность липазы в панкреатическом соке. Ознакомиться с ролью желчных кислот в переваривании липидов.

Вопросы для самоподготовки

1. Понятие «липиды». Классификация, краткая характеристика основных групп: структура, свойства, биологическая роль.
2. Жирные кислоты. Строение, классификации, физико-химические свойства, источники в организме, биологическая роль, транспорт и использование.
3. Строение полиненасыщенных ω -3- и ω -6-жирных кислот (линолевая, α - и γ -линоленовая, арахидоновая), биологическая роль. Синтез эйкозаноидов на основе арахидоновой кислоты с участием циклооксигеназы (простагландины, простациклины, тромбоксаны) и липоксигеназы (лейкотриены). Биологическая роль отдельных типов эйкозаноидов.
4. Триацилглицеролы (ТАГ) как нейтральные жиры: жирно-кислотный состав, свойства, источники в организме, биологическая роль.
5. Холестерол: строение, функции, пути использования, главные производные.
6. Сложные липиды: глицеро- и сфингофосфолипиды, гликолипиды (цереброзиды, ганглиозиды, сульфоллипиды), строение и биологическая роль.
7. Внешний обмен липидов. Разнообразие пищевых жиров, суточная потребность, переваривание. Состав и роль желчи, значение парных желчных кислот (синтез и формулы таурохолевой и гликохолевой кислот). Эмульгирование пищевых жиров, схема эмульгированной капли.

8. Ферменты переваривания нейтральных и сложных жиров, место синтеза, активация. Построение мицелл из продуктов переваривания, всасывание.
9. Нарушения внешнего обмена липидов (переваривания и всасывания), причины и последствия (гиповитаминозы, стеаторея).
10. Пути ресинтеза липидов в клетках кишечника (ТАГ, фосфолипиды, эфиры холестерина). Реакции и значение процесса.
11. Хиломикроны: состав, построение, функция, значение апобелков. Транспорт нейтрального жира к местам депонирования и утилизация хиломикронов в тканях. Роль и регуляция липопротеинлипазы.
12. Липопротеины очень низкой плотности: образование, функции, строение, состав, значение апобелков, утилизация в тканях, роль липопротеинлипазы.
13. Регуляция депонирования нейтральных липидов в тканях. Нарушения транспорта ТАГ в ткани (дислипотеинемии I, V типов).

Самостоятельная работа

1. Составить схему метаболизма липидов. На схеме представить химизм и взаимосвязи путей внешнего обмена и депонирования ТАГ. Приложить к схеме графические представления о транспорте нейтральных жиров.
2. Составить таблицу «Состав и функции транспортных липопротеинов крови» для хиломикронов, липопротеинов очень низкой плотности, переносящих ТАГ.

Лабораторная работа 1

Оценка действия липазы. Влияние желчи на активность липазы

Принцип

Под действием фермента липазы происходит гидролиз эмульгированных жиров молока. Количество образовавшихся жирных кислот определяют путем титрования раствором щелочи в присутствии фенолфталеина.

Материал исследования

Панкреатин – источник липазы.

Реактивы

1) Молоко, 2) раствор желчи, 3) 0,1 М NaOH, 4) 1% спиртовой раствор фенолфталеина.

Проведение анализа

	Контроль,	Опыт 1,	Опыт 2,
Молоко	1,0	1,0	1,0
Дистиллированная вода	2,0	2,0	1,0
Панкреатин	-	1,0	1,0
Раствор желчи	-	-	1,0
	Инкубируют 15 минут при 37°C в термостате или водяной бане		
Фенолфталеин	1–2 капли	1–2 капли	1–2 капли
Раствор NaOH	Титруют до слабозеленой окраски, не исчезающей 30 с		

Результаты титрования фиксируют следующим образом:

V_K – количество мл щелочи, потраченной на титрование контрольной пробы (исходное количество органических кислот, включая жирные),

V_1 – количество мл щелочи, потраченной на титрование пробы 1,

V_2 – количество мл щелочи, потраченной на титрование пробы 2.

Расчёт

1. Количество жирных кислот, образовавшихся при ферментативном гидролизе жира молока без желчи: $X_1 = V_1 - V_K$

2. Количество жирных кислот, образовавшихся при ферментативном гидролизе жира молока в присутствии желчи: $X_2 = V_2 - V_K$

3. Степень влияния желчи на активность липазы рассчитывают по формуле:

$$\text{Активация липазы, \%} = \frac{X_2}{X_1} \cdot 100$$

Оформление итогов работы

Указывают принцип метода, фиксируют результат, делают расчёты и вывод об активности липаз панкреатина, влиянии желчи на переваривание жиров молока.

Лабораторная работа 2

Качественная реакция на желчные кислоты

Принцип

При взаимодействии желчных кислот с оксиметилфурфуролом, образующимся из сахарозы под действием концентрированной серной кислоты, появляется красно-фиолетовое окрашивание (реакция Петтенкофера).

Материал для исследования

Раствор желчи (2:1).

Реактивы

1) 20% раствор сахарозы, 2) концентрированная H_2SO_4 .

Проведение анализа

Сухое предметное стекло кладут на лист белой бумаги, наносят 1 каплю желчи и 1 каплю раствора сахарозы, смешивают стеклянной палочкой. Не двигая стекло, рядом со смесью наносят 3 капли H_2SO_4 , чтобы они краем соприкасались с раствором сахарозы и желчи. Через 2–3 мин на месте слияния капель развивается красная окраска, постепенно переходящая в красно-фиолетовую.

Оформление итогов работы

Указывают принцип метода, фиксируют результаты и делают выводы.

Лабораторная работа 3

Определение кислотного числа жира

Принцип

Кислотное число обозначает количество КОН (мг), необходимое для нейтрализации свободных жирных кислот, содержащихся в 1 г жира.

Материал для исследования

Свежее и прогорклое растительное масло.

Реактивы

1) 0,1 М раствор КОН, 2) 1,0% спиртовой раствор фенолфталеина, 3) хлороформ.

Проведение анализа

	Опыт 1, мл	Опыт 2,
Свежее растительное масло	0,5	-
Прогорклое растительное масло	-	0,5
Хлороформ	0,5	0,5
Фенолфталеин	1–2 капли	1–2 капли
Раствор КОН	Титруют до светлорозовой окраски, не исчезающей в течение минуты	

Расчёт

$$\text{Кислотное число жира} = \frac{a \cdot 0,00561 \cdot 1000}{b \cdot 0,9},$$

где: а – количество раствора щелочи, израсходованное на титрование;
б – навеска соответствующего жира: свежего или прогорклого растительного масла (г); 0,00561 – титр 0,1 М раствора КОН; 0,9 – плотность жира; 1000 – коэффициент перевода г в мг.

Нормальные величины

Свежее растительное масло 1–3 ед.

Практическое значение

Метод предназначен для оценки качества пищевого жира.

Оформление итогов работы

Указывают принцип метода. Фиксируют результаты оценки качества свежего и прогорклого растительного масла, сравнивают их с нормальными величинами, делают выводы о содержании свободных жирных кислот в каждой пробе и о причинах их появления.

Вопросы для самоконтроля

1. Роль жирных кислот в организме. Формулы масляной, пальмитиновой, стеариновой, олеиновой, линолевой, линоленовой, арахидоновой кислот. Представление о биологически активных производных полиненасыщенной арахидоновой кислоты (простагландины, лейкотриены), их роли.
2. Химические формулы простых и смешанных триацилглицеринов, фосфолипидов (содержащих холин, этаноламин, серин, инозитол). Представление о сфинголипидах (сфингомиелин), гликолипидах (цереброзиды, ганглиозиды).
3. Формулы холестерина, его эфиров, парных желчных кислот, витамина D₃, представление о стероидных гормонах.
4. Переваривание и всасывание липидов, ферменты, организация и значение мицелл, пути ресинтеза липидов в энтероците. Синтез, роль и энтерогепатическая рециркуляция желчных кислот.
5. Методы, позволяющие оценить состояние внешнего обмена липидов.
6. Места синтеза нейтрального жира и организация транспорта триацилглице-

ролов к местам депонирования, формы транспортных липопротеинов для нейтрального жира, роль липопротеинлипазы.

7. Процесс депонирования нейтральных липидов в тканях, утилизация нейтральных жиров из депо, роль ферментов и гормонов.

2. ТРАНСПОРТ И ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ОБМЕН ПРОСТЫХ И СЛОЖНЫХ ЛИПИДОВ

Актуальность

Триацилглицеролы (ТАГ) или нейтральные жиры – сложные эфиры глицерина и высших жирных кислот. Знание особенностей обмена нейтральных жиров необходимо для понимания патогенеза таких заболеваний, как ожирение, сахарный диабет, атеросклероз. Фосфолипиды и холестерол образуют клеточные мембраны, находятся в составе липопротеинов. При нарушении синтеза фосфолипидов будет нарушаться нормальный метаболизм клеток и образование транспортных липопротеинов, что ведет к многочисленным нарушениям деятельности органов. На фоне нарушений обмена холестерола формируются такие распространенные заболевания, как атеросклероз и желчекаменная болезнь. Знакомство с методами определения в крови общих липидов и их фракций позволяет использовать эти сведения для выявления патологий, связанных с нарушением липидного обмена. Для диагностики заболеваний данных о содержании общих липидов в сыворотке крови недостаточно. Наиболее информативно определение отдельных фракций липидов (нейтральных жиров, фосфолипидов, общего холестерола и холестерола в составе различных липопротеинов) и расчёт диагностических индексов, коэффициентов на основе этих результатов.

Цель

1. Изучить пути обмена простых и сложных липидов, регуляцию, взаимосвязи между ними.
2. Научиться определять в сыворотке крови содержание триацилглицеролов и кетоновых тел в моче.
3. Освоить методы определения общего холестерола в сыворотке крови, ознакомиться с методами оценки холестерола ЛПВП, индекса и коэффициента атерогенности.

Вопросы для самоподготовки

1. Основные пути внутриклеточного превращения триацилглицеринов (схема).
2. Значение процесса тканевого липолиза. Химизм утилизации нейтральных жиров из депо, роль ферментов и гормонов (гормоночувствительная ТАГ-липаза, ДАГ- и МАГ-липазы), значение аденилатциклазной системы.
3. Пути использования глицерина, химизм окисления глицерина до CO_2 и H_2O , энергетический выход процесса.
4. Транспорт свободных жирных кислот. Пути использования свободных жирных кислот, образующихся при липолизе и поступающих в кровь.
5. Биологический смысл β -окисления. Химизм окисления жирных кислот до CO_2 и воды, связь с ЦТК и дыхательной цепью, энергетический выход.

6. Пути использования ацетил~КоА. Химизм синтеза кетоновых тел, причины и выраженность кетоза при голодании и сахарном диабете. Химизм утилизации кетоновых тел, роль сукцинил~КоА.
7. Роль липогенеза, пути эндогенного синтеза ТАГ. Синтез жирных кислот и глицерола из глюкозы, включение в состав фосфатидной кислоты, ТАГ. Регуляция, значение процесса, особенности течения в жировой ткани и печени, зависимость от ритма питания.
8. Нарушения обмена ТАГ (ожирение, дислиппротеинемии).
9. Биологическая роль фосфолипидов. Катаболизм фосфолипидов и его значение, ключевые фосфолипазы и их значение.
10. Роль фосфатидной кислоты в синтезе ТАГ, фосфолипидов. Причины и механизмы жирового перерождения печени. Химизм синтеза фосфолипидов в тканях. Липотропные вещества: роль аминокислот, витаминов, липотропные факторы – лекарственные средства.
11. Биологическая роль и пути использования холестерина в организме. Химизм синтеза холестерина до мевалоновой кислоты, получение изопентенилдифосфата, представление о дальнейших этапах синтеза (схема).
12. Особенности транспорта экзогенного и эндогенного холестерина в организме, формы транспорта, их состав и ферменты. Роль транспортных липопротеинов (ЛПНП и ЛПВП) в обмене холестерина, значение ферментов АХАТ и ЛХАТ, пути выведения холестерина.
13. Нарушения обмена холестерина (гиперлиппротеинемия, атеросклероз, желчекаменная болезнь).

Самостоятельная работа

1. Представить в схеме липидного обмена химизм синтеза и направления использования фосфолипидов и холестерина, указать взаимосвязи липидного обмена, выходы на общие пути катаболизма. Приложить графические представления о транспорте холестерина.
2. Дополнить таблицу «Состав и функции транспортных липопротеинов крови» данными по перемещению холестерина липопротеинами низкой и высокой плотности.

Лабораторная работа 1

Определение содержания триацилглицеролов в сыворотке крови

Принцип

Триацилглицеролы с помощью липопротеинлипазы гидролизуются до свободных жирных кислот и глицерола. Глицеролкиназа, используя АТФ, фосфорилирует глицерол с образованием глицерол-3-фосфата. Глицерол-3-фосфат окисляется глицерофосфатоксидазой до глюконовой кислоты с образованием пероксида водорода. Пероксид водорода в присутствии фермента пероксидазы и ДГБС окисляет краситель 4-аминоантипирин с превращением его в окрашенный хинонимин. Интенсивность окраски прямо пропорциональна содержанию триацилглицеролов в пробе и определяется фотометрически.

Реактивы

- 1) Рабочий реагент (содержит липопротеинлипазу, глицеролкиназу, глицеро-

фосфатоксидазу, пероксидазу, АТФ, ДГБС, 4-аминоантипирин в калиево-фосфатном буфере), 2) стандартный раствор глицерола, эквивалентный концентрации триглицеридов 2,29 ммоль/л.

Материал для исследования

Сыворотка крови.

Проведение анализа

Готовят опытную и стандартную пробы согласно таблице.

	Опыт, мл	Стандарт, мл
Рабочий реагент	2,0	2,0
Инкубируют 5 мин при 37°С		
Сыворотка	0,02	-
Стандарт	-	0,02
Пробы перемешивают, инкубируют 5 мин при 37°С, измеряют оптическую плотность обеих проб против рабочего реагента при длине волны 546 (510–546) нм в кювете 5 мм.		

Расчёт

$$\text{Триацилглицериды [ммоль/л]} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}}$$

где: E_{оп} – оптическая плотность опытной пробы, E_{ст} – оптическая плотность стандарта, C_{ст} – концентрация стандартного раствора, 2,29 ммоль/л.

Нормальные величины

Сыворотка крови до 1,71 ммоль/л

Практическое значение

Триацилглицериды (нейтральные жиры) являются важным показателем в диагностике нарушений липидного обмена (типов дислиппротеинемий – ДЛП). Содержание нейтральных жиров в плазме крови повышается при атеросклерозе, ишемической болезни сердца, инфаркте миокарда, сахарном диабете, нефротическом синдроме, панкреатите, жировой инфильтрации печени, эссенциальной семейной гиперлипемии. Снижение концентрации триацилглицеролов в плазме крови наблюдается при гипертиреозе.

Оформление работы

Указывают принцип метода, регистрируют результаты анализа, производят расчёты. Сравнивают полученные данные с нормальными значениями. Делают заключение о наличии/отсутствии патологических отклонений и возможной патологии пациента.

Лабораторная работа 2

Определение содержания общего холестерина в сыворотке крови

Принцип

Используется сопряжение ферментативных реакций, катализируемых холестеролаэстеразой (гидролизует эфиры холестерина), холестеролоксидазой (превра-

щает свободный холестерол в холестенон с образованием H_2O_2) и пероксидазой (окисляет 4-аминоантипирин пероксидом водорода в присутствии фенола с получением продукта розово-малинового цвета).

Реактивы

1) Рабочий реактив (холестеролэстераза (200 Е/л), холестеролоксидаза (100 Е/л), пероксидаза (80 Е/л), фенол (6,0 ммоль/л), 4-аминоантипирин (0,5 ммоль/л) в 0,1 М калиевофосфорном буфере); 2) стандартный раствор холестерола (4,65 ммоль/л).

Материал для исследования

Сыворотка крови.

Нормальные величины

Сыворотка	20–29 лет	3,70–6,51 ммоль/л
	30–39 лет	4,25–7,04 ммоль/л
	40–49 лет	4,37–7,70 ммоль/л
	старше 50 лет	4,55–8,24 ммоль/л

Проведение анализа

	Опыт, мл	Стандарт, мл	Контроль, мл
Рабочий реактив	2,0	2,0	2,0
Дистиллиров. вода	–	–	0,02
Сыворотка	0,02	–	–
Стандарт	–	0,02	–
Инкубируют 20 мин при 37°C. Колориметрируют обе пробы против контроля, 500 нм (зеленый светофильтр), кювета 0,5 см.			

Расчёт

$$\text{Холестерол [ммоль/л]} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}},$$

где $E_{\text{оп}}$ и $E_{\text{ст}}$ – оптическая плотность опытной и стандартной проб,
 $C_{\text{ст}}$ – концентрация холестерола в стандартной пробе.

Практическое значение

Гиперхолестеролемиа приводит к раннему развитию атеросклероза и его клинических осложнений – ишемической болезни сердца, инсульта. К нарушениям обмена холестерола относят желчекаменную болезнь. Высокое содержание холестерола в плазме крови выявляется при гиперлипидемиях (типы IIa, IIb и IV), нефротическом синдроме, диабете.

Гипохолестеролемиа наблюдается при гипопроteinемии, циррозе печени, злокачественных опухолях.

Оформление работы

Указывают принцип метода, фиксируют итоги измерений, производят расчёт. Сравнивают полученный результат с нормальными величинами. Делают вывод о возможной патологии пациента.

Лабораторная работа 3

Определение в сыворотке крови холестерина липопротеинов и индекса атерогенности

Принцип

Метод основан на осаждении липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) магния хлоридом и определении содержания общего холестерина в исходной сыворотке и холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) в надосадочной жидкости после осаждения других фракций липопротеинов. Результаты используют для расчёта индекса атерогенности и суммарного холестерина ЛПНП и ЛПОНП.

Материал для исследования

Сыворотка крови.

Реактивы

1) 0,5М раствор $MgCl_2$ в 4% фосфорно-вольфрамовой кислоте, 2) набор реактивов для определения содержания холестерина (см. предыдущую работу).

Проведение анализа

К 1,0 мл сыворотки крови прибавляют 1,0 мл раствора $MgCl_2$. Инкубируют 30 мин в ледяной бане (осаждение ЛПНП и ЛПОНП), центрифугируют 15 мин при 3000 об/мин, надосадок переносят в другую пробирку, закрывают пробкой.

Далее определяют концентрацию холестерина набором реактивов:

в 1-ю пробирку вносят 0,02 мл исходной сыворотки крови (для определения общего холестерина или используют в расчётах данные предыдущей работы),

во 2-ю пробирку – 0,02 мл надосадка (для определения холестерина ЛПВП),

в 3-ю пробирку – 0,02 мл стандартного раствора холестерина,

в 4-ю пробирку – 0,02 мл дистиллированной воды (контроль).

Следующие этапы проводят согласно указаниям предыдущей работы.

Расчёт

Расчёт содержания общего холестерина (см. в предыдущей работе).

Полученные при анализе 2-й и 3-й пробирок данные используют для расчёта содержания холестерина ЛПВП по формуле:

$$\text{Холестерол ЛПВП [ммоль/л]} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}}$$

где $E_{\text{оп}}$ и $E_{\text{ст}}$ – оптическая плотность опытной и стандартной проб,
 $C_{\text{ст}}$ – концентрация холестерина в стандартной пробе.

Суммарное содержание холестерина ЛПНП и ЛПОНП рассчитывают по формуле:

$$[X_{\text{СЛПНП+ЛПОНП}}] = X_{\text{СОбщий}} - X_{\text{СЛПВП}}$$

Риск развития атеросклероза прогнозируют, используя индекс атерогенности. Рассчитывают его по формуле:

$$\text{Индекс атерогенности} = (X_{\text{СОбщий}} - X_{\text{СЛПВП}}) : X_{\text{СЛПВП}}$$

Нормальные величины

Сыворотка крови	
Холестерол ЛПВП	0,9–1,9
Индекс атерогенности	20–30 лет 2,0–2,8
	более 30 лет 3,0–3,5

Практическое значение

Увеличение концентрации холестерина ЛПВП клинически не значимо, наблюдается при доброкачественных состояниях. Снижение содержания холестерина ЛПВП указывает на угрозу атеросклероза. Увеличение индекса атерогенности до 4 и более наблюдается при ишемической болезни сердца и атеросклерозе.

Оформление работы

Указывают принцип метода, фиксируют результаты, делают расчёты и вывод о возможных нарушениях у пациента и прогнозе развития атеросклероза.

Лабораторная работа 4

Экспресс-метод обнаружения кетоновых тел в сыворотке крови и моче

Принцип

Определение основано на реакции Легалья, учитывающей способность ацетона и ацетоацетата в щелочной среде реагировать с нитропруссидом натрия с образованием оранжево-красных комплексов, при подкислении меняющих цвет на вишнёво-красный и фиолетовый (проба чувствительнее к ацетоацетату, чем к ацетону, с β -гидроксимасляной кислотой реакция не происходит). Метод полуколичественный, интенсивность окраски соответствует концентрации кетоновых тел.

Материалы для исследования

Моча нормальная, моча с добавлением ацетона, сыворотка крови.

Реактивы

Диагностические полоски «Кетофан».

Проведение анализа

Полоску берут из пенала упаковки, не прикасаясь руками к желтым зонам индикации. Опускают полоску в исследуемую жидкость (мочу или сыворотку крови) на 1–2 с, лишнюю жидкость удаляют, проводя полоской по краю сосуда. Полоски оставляют в горизонтальном положении и через 1 мин сопоставляют окраску зон индикации для кетоновых тел с цветной шкалой на этикетке упаковки. Концентрацию кетоновых тел определяют по таблице:

Порядковый номер по шкале	1	2	3	4
Концентрация кетоновых тел (ммоль/л)	1,0–2,0	2,0–4,9	4,9–14,7	>14,7

Нормальные величины

Сыворотка крови	0,1–0,6
Моча	отсутствие

Практическое значение

Увеличение содержания кетоновых тел в крови (кетонемия) наблюдается при тяжёлых формах диабета, повышении уровня жиромобилизующих гормонов (в 100–1000 раз), голодании. Кетонемия сопровождается появлением кетонов в моче – кетонурия. Патологическое состояние, вызванное токсическим действием кетоновых тел, носит название «кетоз».

Оформление работы

Указывают принцип метода, заполняют таблицу, отображая в графе «результаты» получаемую окраску, присутствие (+) или отсутствие (–) кетоновых тел. Делают вывод о возможной патологии пациента, указывают практическое значение метода.

Метод	Объект исследования	Выявляемое вещество	Результаты
Полоски «Кетофан»	Моча нормальная		
	Моча патологическая		
	Сыворотка крови		

Вопросы для самоконтроля

1. Синтез жирных кислот, роль цитрата, малонил~КоА, участие НАДФН, синтазы жирных кислот, значение и регуляция процесса.
2. Транспорт жирных кислот в крови. Этапы и реакции окисления жирных кислот до CO_2 и H_2O , роль карнитина и витаминов, энергетика.
3. Пути и реакции синтеза глицерола, окисление до CO_2 и H_2O , энергетика.
4. Липогенез из глюкозы (глицерол, жирные кислоты и НАДФН), значение пирувата и ацетил~КоА. Транспорт ТАГ с участием хиломикроннов и ЛПОНП, обмен ТАГ в тканях, ферменты, регуляция и нарушения обмена, особенности обмена при голодании, насыщении, работе мышц. Бурый и белый жир.
5. Синтез и утилизация кетоновых тел, роль сукцинил~КоА и оксалоацетата. Причины и последствия кетоацидоза. Значение кетоновых тел.
6. Синтез холестерина, участие НАДФН, регуляция. Роль промежуточных продуктов синтеза (липидные якоря, синтез долихола). Транспорт холестерина с участием ЛПНП, ЛПВП, пути использования в организме, выведение.
7. Пути синтеза фосфолипидов, роль фосфатидной кислоты и липотропных веществ (витамины, аминокислоты, холин, инозитол и др.), значение ЦТФ и АТФ. Ключевые фосфолипазы, использование фосфолипидов в синтезе биологически активных веществ и передаче информации в клетку.
8. Патологии, связанные с обменом липидов: ожирение, дис- и гиперлипотеинемии, атеросклероз, жировое перерождение печени, сахарный диабет и кетоацидоз, желчекаменная болезнь. Липидозы как болезни лизосомного накопления.

Тестовые задания

Выбрать один правильный ответ.

1. ЛИПИДЫ НЕ РАСТВОРЯЮТСЯ В

- 1) этаноле
- 2) ацетоне
- 3) хлороформе
- 4) воде

2. К НАСЫЩЕННЫМ ЖИРНЫМ КИСЛОТАМ ОТНОСИТСЯ

- 1) линолевая
- 2) линоленовая
- 3) арахидоновая
- 4) стеариновая

3. К НЕНАСЫЩЕННЫМ ЖИРНЫМ КИСЛОТАМ ОТНОСИТСЯ

- 1) пальмитиновая
- 2) стеариновая
- 3) миристиновая
- 4) линолевая

4. ТРИАЦИЛГЛИЦЕРОЛ СОДЕРЖИТ В СВОЕМ СОСТАВЕ

- 1) глицерол
- 2) парафин
- 3) бутанол
- 4) хлороформ

5. К ФОСФОЛИПИДАМ НЕ ОТНОСИТСЯ

- 1) фосфатидилхолин
- 2) фосфатидилсерин
- 3) фосфатидилэтаноламин
- 4) цереброзид

6. ВСАСЫВАНИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ИЗ КИШЕЧНИКА ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ В КОМПЛЕКСЕ С

- 1) желчными кислотами
- 2) фосфорной кислотой
- 3) серной кислотой
- 4) аспарагиновой кислотой

7. ХОЛЕСТЕРОЛ МОЖЕТ ПРИСОЕДИНЯТЬ

- 1) 1 жирную кислоту
- 2) 2 жирные кислоты
- 3) 3 жирные кислоты
- 4) 4 жирные кислоты

8. СИНТЕЗ ЛИПИДОВ КОНТРОЛИРУЕТСЯ

- 1) инсулином
- 2) адреналином
- 3) глюкагоном
- 4) тироксином

9. ЛИПОЛИЗ КОНТРОЛИРУЕТСЯ

- 1) инсулином
- 2) глюкагоном и адреналином
- 3) глюкокортикоидами
- 4) эстрогеном

10. К СФИНГОЛИПИДАМ НЕ ОТНОСИТСЯ

- 1) глобозид
- 2) цереброзид
- 3) ганглиозид
- 4) кардиолипин

Ситуационные задачи

1. У больного при зондировании двенадцатиперстной кишки установлена задержка оттока желчи из желчного пузыря.
Указать, влияет ли это на переваривание жиров. Пояснить, какие последствия может иметь такая патология.
2. Содержание триацилглицеролов и фосфолипидов в сердечной мышце в 1,5–2 раза больше, чем в скелетной мускулатуре.
Пояснить биохимический смысл этих различий. Показать, связана с этим высокая чувствительность миокарда к кислородной недостаточности или не связана.

ОБМЕН УГЛЕВОДОВ И ЛИПИДОВ. БИОЭНЕРГЕТИКА (КОНТРОЛЬ ПО ТЕМАМ 5–8)

Вопросы для самоподготовки

Биоэнергетика

1. Понятие обмена веществ. Фазы обмена веществ (распад и синтез), их взаимосвязь. АТФ и другие высокоэнергетические соединения, значение НАДФН. Цикл АТФ-АДФ. Основные пути фосфорилирования АДФ и использования АТФ.
2. Схема катаболизма питательных веществ, этапы (специфические и общие пути), их значение и конечные продукты.
3. Окислительное декарбоксилирование пирувата: последовательность реакций, связь с дыхательной цепью митохондрий, регуляция, участие витаминов и их характеристика (биологическое название, признаки недостаточности, суточная потребность, пищевые источники). Лекарственные препараты, применяемые для коррекции нарушений окислительного декарбоксилирования.
4. Цикл трикарбоновых кислот: последовательность реакций, участие витаминов, связь с дыхательной цепью, энергетический эффект, регуляция. Пути стимуляции цикла трикарбоновых кислот. Анаплеротические реакции пополнения метаболитов ЦТК.
5. Биологическое окисление (тканевое дыхание), теории Баха и Паладина, современные представления. Окислительные и неокислительные пути образования CO_2 . Получение воды и CO_2 в процессе тканевого дыхания. Функции дыхательной цепи.
6. Окислительное фосфорилирование цепи переноса электронов и субстратное фосфорилирование ЦТК. Структурная организация митохондриальной цепи переноса электронов, ферменты и коферменты. Митохондриальный потенциал, механизм сопряжения окисления с фосфорилированием в дыхательной цепи. Механизм образования АТФ с участием H^+ /АТФ-синтетазы.
7. НАД-зависимые дегидрогеназы: строение окисленной и восстановленной форм НАД, активный центр, характеристика входящего в состав НАД витамина (название, суточная потребность, пищевые источники, недостаточность), важнейшие субстраты, НАДН-дегидрогеназа и переносчики электронов дыхательной цепи митохондрий, коэффициент P/O.
8. ФАД-зависимые дегидрогеназы: строение окисленной и восстановленной форм ФАД, активный центр, характеристика входящего в состав ФАД витамина (название, суточная потребность, пищевые источники, недостаточность), важнейшие субстраты и ферменты, дальнейший путь электронов в дыхательной цепи митохондрий, коэффициент P/O.
9. Дыхательный контроль. Разобщение дыхания и фосфорилирования. Ингибиторы дыхательной цепи, блокаторы процессов тканевого дыхания, ионофоры. Гипоэнергетические состояния. Термогенез.

Обмен углеводов

1. Углеводы и их роль в организме. Классификация углеводов по структуре и функциям. Строение основных представителей углеводов: моно-, ди-, полисахариды (пентозы, глюкоза, мальтоза, галактоза, сахароза, крахмал, целлюлоза, гликоген). Представление о структуре гликозаминогликанов (мукополисахаридов): гиалуроновая, хондроитинсерная кислоты, гепарин. Углеводы – лекарственные препараты.
2. Углеводы пищи, переваривание и всасывание. Особенности переваривания в полости рта и тонком кишечнике. Ферменты полостного пищеварения углеводов и пристеночные комплексы. Нарушения функционирования ферментов, последствия.
3. Роль печени в обмене углеводов. Депонирование глюкозы, условия. Взаимопревращения углеводов: метаболизм галактозы и фруктозы в печени и его нарушения.
4. Биосинтез и мобилизация гликогена: последовательность реакций, физиологическое значение. Регуляция активности фосфорилазы и синтазы гликогена (роль цАМФ, ионов кальция и кальмодулина). Особенности обмена гликогена в печени и в мышцах. Гликогенозы и агликогенозы.
5. Пути превращения глюкозы в тканях. Распад углеводов в анаэробных условиях: гликолиз, гликогенолиз – последовательность реакций, балансовые уравнения, энергетический эффект, способ образования АТФ, локализация процессов. Сходства и отличия гликолиза, гликогенолиза и спиртового брожения. Дальнейшая судьба молочной кислоты.
6. Превращения углеводов в аэробных условиях. Аэробный распад глюкозы: последовательность реакций, энергетический эффект. Биохимические механизмы эффекта Пастера. Роль аэробного распада глюкозы в мозге.
7. Пентозофосфатный путь превращения глюкозы. Химизм окислительной стадии и НАДФН, понятие о реакциях и ферментах системы структурной перестройки. Регуляция процесса, взаимосвязь с гликолизом. Роль пентозофосфатного пути в эритроцитах и лейкоцитах, клетках активно пролиферирующих тканей организма. Наследственная энзимопатия глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы.
8. Биосинтез глюкозы (глюконеогенез): возможные предшественники, последовательность реакций, источники энергии и ферменты. Глюкозолактатный цикл (цикл Кори), глюкозоаланиновый цикл. Значение глюконеогенеза, регуляция глюконеогенеза гормонами.
9. Регуляция концентрации глюкозы в крови. Пути поступления и пути расходования глюкозы крови. Влияние на эти процессы гормонов: инсулина, глюкагона, адреналина и глюкокортикоидов. Изменения обмена углеводов при коротком и длительном голодании, стрессе и применении глюкокортикоидов (стероидный диабет).
10. Нарушение обмена углеводов при сахарном диабете, типы сахарного диабета. Врожденные нарушения обмена углеводов (галактоземия, гликогенозы, интолерантность к сахарозе, лактозе).

Обмен липидов

1. Липиды, строение, классификация. Разнообразие липидов в организме. Характеристика основных классов липидов: химическая структура смешанных триацилглицеринов, фосфолипидов (фосфатидилхолина, фосфатидилсерина и фосфатидилэтаноламина), холестерина и его эфиров, физико-химические свойства, биологическая роль. Представление о химической структуре сфинголипидов и гликолипидов (цереброзидов, ганглиозидов).
2. Высшие жирные кислоты. Классификация, физико-химические свойства. Источники жирных кислот, биологическая роль, транспорт и использование. Структура масляной, стеариновой, пальмитиновой, олеиновой, линолевой, ω -3 и ω -6 линоленовых, арахидоновой кислот. Производные незаменимых жирных кислот: простагландины и лейкотриены, роль, ключевые ферменты синтеза. Особенности жирных кислот, участвующих в механизмах памяти.
3. Внешний обмен липидов. Пищевые жиры: суточная потребность, переваривание, всасывание. Характеристика мицелл. Роль ферментов и желчных кислот. Синтез и строение таурохолевой и гликохолевой кислот.
4. Ресинтез липидов в стенке кишечника. Хиломикроны – основная транспортная форма пищевых липидов; состав, строение, функции. Утилизация хиломикронов в крови, других тканях. Роль липопротеинлипазы. Депонирование.
5. Биологические нормы содержания общих липидов и триацилглицеринов в крови. Причины и последствия нарушений переваривания и всасывания жиров (гиповитаминозы, стеаторея).
6. Основные пути внутриклеточного превращения триацилглицеринов. Гормональная регуляция (схема). Значение основных гормонов.
7. Липолиз – путь мобилизации и катаболизма нейтральных жиров. Роль процесса. Гормон-чувствительная липаза, роль аденилатциклазной системы в регуляции её активности.
Транспорт и использование жирных кислот, образующихся при липолизе.
Жирные кислоты и миокард; белки, связывающие жирные кислоты.
8. β -Окисление жирных кислот, связь с ЦТК и дыхательной цепью, распад до углекислого газа и воды и энергетический выход. Другие пути использования ацетил-КоА. Синтез и утилизация кетонных тел, роль сукцинил-коА и ЦТК. Причины кетоза при голодании и диабете.
9. Химизм синтеза жирных кислот, роль CO_2 , АТФ и НАДФН.
10. Пути получения глицерина и его обмен, направления утилизации, энергетический выход при распаде. Особенности глюконеогенеза из глицерина и синтез глицерина из глюкозы (роль гликолиза). Регуляция процесса инсулином. Нарушения обмена глицерина.
11. Липогенез. Пути эндогенного синтеза триацилглицеринов. Биосинтез жиров в жировой ткани и в печени. Источники глицерина, жирных кислот, энергии.
12. Синтез триацилглицеринов через фосфатидную кислоту. Липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП) – основная транспортная форма триацилглицеринов печени. Состав, строение, функции, утилизация ЛПОНП в крови и тканях. Роль липопротеинлипазы. Регуляция активности фермента.
13. Понятие сложных липидов. Обмен фосфолипидов, фосфолипазы, значение

фосфолипаз А₂ и С. Представление о биосинтезе фосфолипидов. Роль аминокислот, витаминов. Источники энергии. Транспортные формы. Нарушение процесса. Липотропные вещества.

14. Холестерол пищи и синтез в организме (до мевалоновой кислоты – химизм, далее – схема с указанием изопентенила, геранила, фарнезила, участия НАДФН), обмен и функции холестерина, роль транспортных липопротеинов в обмене. Направления использования холестерина в организме. Пути выведения холестерина. Нарушение обмена холестерина (атеросклероз, желчекаменная болезнь).
15. Взаимосвязь обмена жиров и углеводов. Схема превращения глюкозы в жиры, степень обратимости процессов. Роль пентозофосфатного пути для синтеза жиров. Влияние гормонов (инсулина, глюкагона, адреналина, глюкокортикоидов) на обмен жиров и углеводов.
16. Ацетил~КоА. Пути образования и пути использования в организме: аэробные превращения глюкозы, жирных кислот, синтез жирных кислот, холестерина, ацетоновых тел.
17. Регуляция обмена липидов. Нарушение обмена липидов: нарушение транспорта из крови в ткани, кетонемия и кетонурия, гиперхолестеринемия, атеросклероз, ожирение, жировая дистрофия печени, гиперлиппротеинемии, наследственные нарушения обмена липидов.

Практическая часть

1. Переваривание углеводов в желудочно-кишечном тракте.
2. Определение кислотного числа жира.
3. Качественная реакция на желчные кислоты.
4. Влияние желчи на активность липазы.
5. Определение наличия молочной кислоты в мышечной ткани и желудочном соке реакцией Уффельмана.
6. Определение концентрации глюкозы в сыворотке крови глюкозооксидазным методом.
7. Влияние сахарной нагрузки на содержание глюкозы в крови, глюкозотолерантный тест.
8. Определение содержания триацилглицеринов в сыворотке крови.
9. Определение содержания холестерина в сыворотке крови.
10. Определение в сыворотке крови холестерина липопротеинов и индекса атерогенности.
11. Экспресс-метод определения содержания глюкозы в моче («Биофан-3», «Глюкотест» и др.).
12. Экспресс-метод определения содержания кетоновых тел в моче («Кетофан», «Диафан» и др.).

ТЕМА 9. ОБМЕН БЕЛКОВ. ОБЕЗВРЕЖИВАНИЕ АММИАКА. НАРУШЕНИЕ МЕТАБОЛИЗМА БЕЛКОВ

1. ВНЕШНИЙ ОБМЕН БЕЛКА, ГНИЕНИЕ В КИШЕЧНИКЕ И ДЕТОКСИКАЦИЯ В ПЕЧЕНИ

Актуальность

Пищевые продукты животного и растительного происхождения являются главными источниками белков для человека. В желудочно-кишечном тракте идет последовательное расщепление белков до аминокислот. Протеолитические ферменты (класс гидролаз) обладают относительно широкой специфичностью. Пепсин желудочного сока устойчив в сильноокислой среде, условия для активации и действия пепсина создаются в желудке за счёт соляной кислоты, рН чистого желудочного сока – 1,0–2,0. Кроме того, соляная кислота определяет бактерицидность желудочного сока. Патология пищеварения может повлечь за собой нарушение обмена белка и функционирования систем организма. Поэтому методы анализа состава желудочного сока важны для оценки его переваривающей способности в норме и при патологии.

Цель

1. Изучить биологическую ценность пищевых белков, переваривание и всасывание в желудочно-кишечном тракте, свойства пищеварительных пептидаз.
2. Освоить методы качественного и количественного анализа желудочного сока для оценки секреторной функции желудка здорового организма и возможных отклонений при патологии.

Вопросы для самоподготовки

1. Роль белков в организме.
2. Понятие «азотистый баланс» и возможные его изменения (равновесие, положительный и отрицательный азотистый баланс).
3. Нормы белка в питании. Биологическая ценность белков.
4. Переваривание белков в желудке. Роль соляной кислоты, гистамина.
5. Механизмы активации ферментов (пепсин, трипсин, химотрипсин).
6. Переваривание белков ферментами желудочно-кишечного тракта, специфичность действия, локализация эндо- и экзопептидаз, дипептидазы.
7. Всасывание аминокислот. Транспортёры.
8. Пути превращения невсосавшихся аминокислот под действием микрофлоры кишечника. Химизм (реакции) образования кадаверина и путресцина, сероводорода и других газов, крезола и фенола, скатола и индола при метаболизме аминокислот микрофлорой кишечника. Получение индикана, диагностическое значение.
9. Обезвреживание продуктов распада белков в печени. Этапы окисления и конъюгации с серной и глюкуроновой кислотами. Роль ФАФС и УДФГК.
10. Характерные нарушения при длительном белковом голодании и болезни «квашиноркор».

Самостоятельная работа

Заполнить таблицу протеолитических ферментов желудочно-кишечного тракта (пепсин, трипсин, химотрипсин, эластаза, карбоксипептидаза, аминопептидаза):

Фермент	Место действия	Оптимум рН	Субстратная специфичность

Лабораторная работа 1

Идентификация гистамина солями кобальта

У гистамина очень важная роль в регуляции переваривания белка. При нахождении пищи в желудке происходит нейрогуморальная регуляция сокоотделения, когда секреция желудочного сока стимулируется за счет вагуса, метасимпатической нервной системы, гастрина, гистамина, питательных веществ (белки, пептиды, аминокислоты). Гистамин – один из сильнейших стимуляторов желудочной секреции и вызывает субмаксимальную и максимальную гистаминовую секрецию (зависит от дозы). Гистамин в этом качестве используют при обследовании пациентов гастроэнтерологического профиля (зондирование).

Принцип

Гистамин реагирует с солями кобальта с образованием окрашенных в красно-фиолетовый цвет комплексных солей.

Реактивы

1) Навеска гистамина (0,01–0,02 г), 2) раствор кобальта нитрата или кобальта хлорида, 3) раствор натрия гидроксида.

Проведение анализа

Навеску гистамина растворить в 1,0 мл воды, добавить 2–3 капли раствора соли кобальта и 1 каплю раствора NaOH. Выпадает красно-фиолетовый осадок.

Оформление работы

Указывают принцип метода, регистрируют результаты, делают вывод о наличии гистамина. Поясняют роль гистамина в желудочной секреции.

Лабораторная работа 2

Обнаружение свободной соляной кислоты в желудочном соке при помощи индикаторов

Отклонения в составе пищеварительных соков или появление в них компонентов, не содержащихся в физиологических условиях, даёт важную информацию о патологии пищеварения. В клинической практике методы анализа желудочного сока используют для диагностики и лечения заболеваний. При анализе желудочного сока определяют его общее количество, цвет, запах, наличие слизи, общую кислотность, количество свободной и связанной соляной кислоты, присутствие молочной кислоты, крови и желчных пигментов.

Принцип

В присутствии свободной соляной кислоты в желудочном соке индикатор «конго красный» меняет окраску на синюю, оставаясь в нейтральной и щелочной

среде красным (зона перехода рН 3,0–5,2). Индикатор пара-диметиламиноазобензол (ПДААБ) в присутствии свободной НСl имеет красную окраску, в щелочной среде – жёлтую (зона перехода рН 2,3–4,2).

Реактивы

1) Индикаторная бумага «конго», 2) 0,5% спиртовой раствор индикатора ПДААБ, 3) универсальная индикаторная бумага (рН 1–10).

Материалы для исследования

Желудочный сок нормальный и патологический (с разной кислотностью).

Проведение анализа

1. На две полоски индикаторной бумаги «конго красный» наносят стеклянной палочкой по 1 капле желудочного сока (нормальный и патологический).
2. В две пробирки вносят по 10 капель исследуемого желудочного сока (нормальный и патологический), добавляют по 2 капли индикатора ПДААБ.
3. На две разные полоски универсальной индикаторной бумаги наносят стеклянной палочкой по 1 капле желудочного сока (нормальный и патологический) для оценки показателя рН.

Практическое значение

Свободная соляная кислота способствует превращению пепсиногена в пепсин, денатурации пищевых белков, оказывает бактерицидное действие, создает оптимальную рН среды для воздействия пепсина, стимулирует выработку секрета, ускоряет всасывание ионов железа. При воспалительных процессах в желудке имеет место нарушение секреции соляной кислоты и, соответственно, переваривания белков.

Оформление работы

Указывают принцип метода, регистрируют результат в таблице, делают вывод о кислотности сока.

Образец желудочного сока	Изменение окраски			Величина рН	Заключение
	Конго	ПДААБ	Универс.		
Нормальный					
Патологический					

Лабораторная работа 3

Определение общей кислотности, свободной и связанной соляной кислоты в одной порции желудочного сока

В работе последовательно исследуются образцы нормального и трех типов патологического желудочного сока. Сначала необходимо провести качественные реакции на свободную НСl (лабораторная работа 1). Если в итоге бумага «конго» приобретает синюю окраску, а пара-диметиламиноазобензол (ПДААБ) оранжево-красную, то в одной порции желудочного сока определяют все виды кислотности, как описано ниже. Если бумага «конго» остается красной, а ПДААБ окрашивает пробу в жёлтый цвет, то в этом образце можно определить только общую кислотность в присутствии фенолфталеина.

Принцип

Метод основан на определении кислотных веществ желудочного сока путём титрования раствором NaOH в присутствии двух индикаторов – ПДААБ (интервал перехода рН 2,3–4,2) и фенолфталеина (зона перехода рН 8,2–10,0). По изменению окраски индикатора ПДААБ от красной к оранжевой определяют свободную соляную кислоту, а по переходу окраски фенолфталеина (от бесцветной к розовой) – общую кислотность.

Реактивы

1) 0,1 М раствор NaOH, 2) 1% спиртовой раствор фенолфталеина, 3) 0,5% спиртовой раствор пара-диметиламиноазобензола.

Материалы для исследования

Образцы нормального и патологического (№ 1, № 2, № 3) желудочного сока.

Проведение анализа

В коническую колбу помещают 5 мл исследуемого желудочного сока, добавляют по 2 капли ПДААБ и фенолфталеина. В присутствии свободной HCl наблюдается красное окрашивание, при отсутствии – жёлтое. Титруют 0,1 М раствором NaOH до появления оранжево-красной окраски, отмечают объём (мл), пошедший на титрование свободной HCl – 1-й пункт титрования. Продолжают титрование до появления лимонно-жёлтой окраски, снова отмечают объём щелочи, израсходованной с начала титрования – 2-й пункт. Продолжают титрование до появления розовой окраски, отмечают объём щелочи, пошедший на всё титрование – 3-й пункт. *Все отсчёты делают от нулевой отметки!*

Расчёт

За единицу кислотности желудочного сока принимают объём 0,1 М NaOH (мл), необходимый для нейтрализации кислых эквивалентов в 100 мл желудочного сока (титрационные единицы) или количество миллимолей HCl в 1 л сока. Численно эти величины совпадают (40 ТЕ = 40 ммоль/л).

Пример расчёта. На титрование 5 мл желудочного сока до первой отметки израсходовано 2,0 мл NaOH, до второй – 2,22 мл, до третьей – 3,18 мл.

а) Содержание свободной HCl будет равно:

$$(2 \times 100) : 5 = 40 \text{ ммоль/л}$$

б) Содержание общей HCl рассчитывают как среднее арифметическое между вторым и третьим пунктами титрования:

$$(2,22 + 3,18) : 2 \times (100 : 5) = 40 \text{ ммоль/л}$$

в) Содержание связанной HCl составит:

$$54 - 40 = 14 \text{ ммоль/л}$$

г) Общая кислотность будет равна:

$$(3,18 \times 100) : 5 = 63,6 \text{ ммоль/л}$$

Нормальные величины

Свободная HCl – 20–40 ммоль/л;
связанная HCl – 10–20 ммоль/л;
общая кислотность 40–60 ммоль/л.

Оформление работы

Указывают принцип метода, результаты регистрируют в виде таблицы, производят расчёты и фиксируют их в таблице, делают вывод о наличии HCl в исследуемых образцах желудочного сока.

Образец желудочного сока	Количество 0,1 М NaOH, израсходованное на титрование, мл			Соляная кислота, моль/л			Общая кислотность
	1-й пункт	2-й пункт	3-й пункт	своб.	общая	связан.	
Нормальный							
Патологический 1							
Патологический 2							
Патологический 3							

Практическое значение

Определение кислотности желудочного сока важно для диагностики ряда заболеваний желудка. При патологии кислотность может быть нулевой, повышенной, пониженной. Увеличение содержания свободной HCl и общей кислотности (гиперхлоргидрия) имеет место при гиперацидном гастрите, часто сопровождается язвенной болезнью желудка и двенадцатипёрстной кишки. Пониженная кислотность (гипохлоргидрия) встречается при гипоацидном гастрите, иногда при язвенной болезни желудка. Ахлоргидрия (полное отсутствие соляной кислоты) и значительное снижение общей кислотности отмечается при хроническом гастрите и раке желудка. Отсутствие HCl и пепсина (ахилия) связано со злокачественными новообразованиями желудка, злокачественным малокровием. Ахлоргидрия сопровождается появлением в желудке микроорганизмов и сопутствующих продуктов брожения – молочной, масляной, уксусной кислот.

Лабораторная работа 4 (теоретически)

Беззондовый метод определения кислотности желудочного сока (ацидотест)

Принцип

Введённый в желудок рег ос краситель (2,4-диамино-4-этоксизобензол) освобождается из драже под действием свободной HCl ($pH < 3,0$). Через 1,5 часа краситель появляется в моче. При подкислении мочи кислотой (25% раствор HCl) образуется соляно-кислая соль красителя красного цвета. Показатель кислотности желудочного сока оценивают, сопоставляя полученную окраску со стандартной шкалой.

Реактивы

1) 25% раствор соляной кислоты, 2) таблетки кофеинбензоата натрия, 3) драже красителя 2,4-диамино-4-этоксизобензола.

Материал для исследования

«Контрольная» моча и моча, собранная через 1,5 часа после приёма красителя.

Проведение анализа

Подготовка пациента: после голодания в течение 8 часов и опорожнения мочевого пузыря пациент принимает кофеинбензоат натрия (в 100 мл воды), стиму-

лирующего желудочную секрецию и диурез. Через 1 час собирает «контрольную» мочу. Пациент, не разжёвывая, проглатывает драже красителя и через 1,5 часа снова собирает мочу. Обе порции мочи анализируют одновременно: каждую доводят водой до 200 мл, отбирают по 5 мл разбавленной мочи, добавляют по 5 мл 25% HCl и сравнивают со шкалой.

Практическое значение

Метод «ацидотест» удобен, надежен, щадит больного, рекомендуется при противопоказаниях к фракционному зондированию (гипертоническая болезнь, нейропатии), может применяться у детей, при необходимости скринингового обследования групп пациентов.

Оформление работы

Отмечают суть метода «ацидотест», показания к его применению в клинике, границы и области практического применения, указывают его преимущества и недостатки.

Лабораторная работа 5

Обнаружение патологической кислотности желудочного сока

Молочная кислота является конечным продуктом гликолиза, протекающего в анаэробных условиях. При снижении кислотности желудочного сока (гипоацидный гастрит и другие заболевания с угнетением синтеза соляной кислоты) снижаются его бактерицидные свойства, вследствие чего анаэробная микрофлора, попадающая из полости рта в желудок, оказывается в оптимальных условиях и активно нарабатывает лактат в процессе молочно-кислого брожения углеводов.

Принцип

Метод основан на реакции Уффельмана: при взаимодействии с лактатом комплексное соединение фенолята железа (III) фиолетового цвета превращается в малодиссоциирующую соль лактата железа зеленовато-жёлтого цвета.

Реактивы

1) 1% раствор фенола, 2) 1% раствор $FeCl_3$, 3) 4% раствор молочной кислоты.

Материал для исследования

Нормальный и патологический желудочный сок.

Проведение анализа

В пробирке готовят раствор фенолята железа из 2,0 мл раствора фенола и 3 капли раствора $FeCl_3$, смесь разливают поровну в 3 пробирки. Затем в 1-ю пробирку добавляют 1–2 капли раствора лактата (контроль), во 2-ю – нормальный желудочный сок, в 3-ю – патологический. При наличии лактата фиолетовая окраска заменяется зеленовато-жёлтой, при его отсутствии жидкость обесцвечивается.

Практическое значение

Наличие патологической кислотности (продуктов брожения: молочной, уксусной, масляной кислот) в желудочном соке указывает на сдвиг показателя кислотности от нормы в сторону повышения pH и появление в желудке анаэробных микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности.

Оформление работы

Указывают принцип метода, регистрируют результаты в таблице, делают вывод о наличии/отсутствии лактата и активности анаэробной микрофлоры в пробах.

Исследуемая проба	Результат
Желудочный сок	Нормальный
	Патологический

Лабораторная работа 6 Обнаружение крови в желудочном соке с помощью диагностических полосок "Гемофан"

Принцип

Зона индикации диагностических полосок «Гемофан» содержит стабилизированную органическую гидроперекись, кислотный буфер, хромоген. Гемоглобин обладает ферментативной пероксидазной активностью, поэтому катализирует окисление хромогена гидроперекисью с образованием продуктов синего цвета. В присутствии свободного гемоглобина зона индикации окрашивается равномерно, интактные эритроциты проявляются как яркие синие точки.

Материал для исследования

Образцы нормального и патологического желудочного сока.

Проведение анализа

В каждый образец желудочного сока погружают индикаторную зону полоски, вынимают, через 30–60 секунд сравнивают с прилагаемой на этикетке цветной шкалой. По индикаторным зонам шкалы, соответствующим цвету изучаемых образцов, определяют содержание гемоглобина/эритроцитов.

Обозначения на шкале сравнения	Концентрация гемоглобина, г/л	Количество эритроцитов, $\times 10^6/\text{л}$
1	15–45	5–15
2	45–150	15–50
3	150–240	50–80
4	≥ 300	≥ 100

Практическое значение

Кровь, кровяные пигменты могут попадать в сок при изъязвлении стенок желудка. Желчные пигменты забрасываются в желудок из двенадцатипёрстной кишки вследствие антиперистальтики.

Оформление работы

Указывают принцип метода, регистрируют результаты анализа, делают вывод о наличии крови в образцах желудочного сока, возможных причинах её появления и вероятных последствиях желудочных кровотечений.

Вопросы для самоконтроля

1. Азотистый баланс и его нарушения. Биоценность белков пищи, нормы белка в питании. Последствия недостаточности и избытка белка в питании.
2. Состав желудочного сока, роль отдельных компонентов – HCl, ферментов,

муцинов. Переваривание белков в желудке у взрослых и детей.

3. Пути активации и специфичность действия протеолитических ферментов желудочно-кишечного тракта. Полостное и пристеночное пищеварение. Эндо- и экзопептидазы, локализация в пищеварительном тракте. Всасывание аминокислот, транспортеры.
4. Метаболизм аминокислот под действием ферментов бактерий толстого кишечника с образованием газов, трупных ядов и других токсичных продуктов распада.
5. Нейтрализация в печени токсичных продуктов распада аминокислот с участием УДФГК и ФАФС.

2. ОБЩИЕ И ЧАСТНЫЕ ПУТИ МЕТАБОЛИЗМА АМИНОКИСЛОТ

Актуальность

Обмен белков выполняет ряд свойственных живой материи уникальных функций, поддерживая динамичное состояние между организмом и внешней средой. Свыше 20 природных аминокислот, часть из которых незаменимы, включаются в реакции общих и специфических путей превращения, что объясняет разнообразие и разветвленность метаболизма аминокислот. В медицине описаны многочисленные случаи нарушения различных этапов обмена аминокислот. Помимо превращений, свойственных всем аминокислотам, имеются последовательности реакций, характерные для каждой аминокислоты. Образовавшиеся продукты реакций могут играть важную, а иногда и решающую роль в процессах обмена веществ и определять физиологическое состояние организма. Известно более ста болезней, обусловленных наследственными дефектами обмена аминокислот. Аминокислоты и их производные широко применяются в клинической практике в качестве лекарственных препаратов.

Цель

1. Ознакомиться с главными путями превращений аминокислот и транспортной системой их проникновения через клеточные мембраны.
2. Изучить механизмы основных реакций внутриклеточного обмена аминокислот (дезаминирование, декарбоксилирование, трансаминирование) и ознакомиться с методом оценки активности аминотрансфераз (аланиновой и аспарагиновой) в сыворотке крови и их клиническим значением.
3. Изучить направления основных путей превращений отдельных аминокислот, проявления патологии азотистого обмена. Ознакомиться с экспресс-методом диагностики фенилкетонурии.
4. Освоить разделение аминокислот хроматографическим методом.

Вопросы для самоподготовки

1. Основные пути восполнения аминокислот в тканях.
2. Система транспорта аминокислот через клеточные мембраны.
3. Механизм реакций дезаминирования аминокислот. Окислительное дезаминирование. Оксидазы аминокислот. Анаэробная дегидрогеназа глутаминовой

кислоты. Строение коферментов.

4. Значение реакций переаминирования. Механизм реакций трансаминирования. Строение аминотрансфераз, коферменты. Клинико-диагностическое значение ферментов трансаминирования – АсАТ и АлАТ.
5. Реакции декарбоксилирования. Строение ферментов, механизм реакций с участием пиридоксальных коферментов, продукты.
6. Получение биогенных аминов, роль в организме. Дальнейшие пути превращения аминов, реакции нейтрализации и участие флавиновых коферментов.
7. Анаболические процессы, в которых участвуют аминокислоты.
8. Знакомство со специфическими путями обмена протеиногенных аминокислот (глицина, серина, метионина, цистеина, фенилаланина, тирозина, триптофана, дикарбоновых аминокислот), патологии при нарушениях обмена.

Темы для рефератов и самостоятельной работы

Используя темы для самостоятельной работы, дополнить соответствующие разделы таблиц аминокислот (приложение 1) и витаминов (приложение 2).

1. Основные метаболические превращения фенилаланина и тирозина, ферменты. Реакции синтеза гормонов и медиаторов (катехоламины, тиреоиды) из фенилаланина и тирозина, роль витамина С.
2. Биохимические дефекты при фенилкетонурии, алкаптонурии и альбинизме, характерные особенности заболеваний.
3. Пути использования глицина в организме. Реакции синтеза глицина из серина и треонина, ферменты.
4. Реакции катаболизма глицина, образование производных тетрагидрофолиевой кислоты (ТГФК).
5. Вещества, синтезирующиеся при участии различных производных ТГФК, причина нарушения их синтеза при гиповитаминозе фолиевой кислоты. Связь фолиевой кислоты с антибактериальной активностью сульфаниламидных препаратов, работа фолатов в тандеме с витамином В₁₂, участие метионина.
6. Реакции синтеза серина. Роль серина в биосинтетических процессах.
7. Серосодержащие аминокислоты. Метаболические превращения цистеина и его серы.
8. Реакция образования аденозилметионина, его роль в процессах трансметилирования, значение для пути синтеза креатина и креатинина, синтеза адреналина, фосфатидилхолина.
9. Катаболизм триптофана, метаболиты процесса, их значение. Причины развития пеллагры при недостатке триптофана в пище. Нарушения обмена триптофана при болезнях «моча с запахом кленового сиропа» и Хартнупа.
10. Особенности обмена дикарбоновых аминокислот и их амидов, связь обмена дикарбоновых аминокислот с цитратным циклом, их участие в процессах биосинтеза.
11. Аминоацидурия. Причины гипераминоацидурии, метаболические дефекты при цистинозе, цистинурии, гепатоцеребральной дистрофии.

Лабораторная работа 1

Определение активности аминотрансфераз сыворотки крови

Актуальность

Трансаминирование – обратимый перенос α -аминогруппы аминокислоты на кетокислоту без промежуточного отщепления аммиака. Процесс катализируют внутриклеточные ферменты аминотрансферазы – аспартат-аминотрансфераза (АсАТ), аланин-аминотрансфераза (АлАТ) и другие; их коферментом выступает пиридоксальфосфат. Процесс трансаминирования протекает в печени, почках, сердце, скелетных мышцах. В сыворотке крови активность аминотрансфераз низка, но резко возрастает при нарушении целостности мембран клеток тканей и органов (синдром цитолиза).

Материал для исследования

Сыворотка крови.

Принцип

В результате переаминирования, происходящего под действием АсАТ и АлАТ, образуются оксалоацетат и пируват. Оксалоацетат, подвергаясь декарбоксилированию, превращается в пируват. При добавлении кислого 2,4-динитрофенилгидразина (ДНФГ) процесс останавливается, получается гидразон пирувиноградной кислоты, который в щелочной среде даёт окрашивание с интенсивностью, пропорциональной количеству образовавшегося пирувата.

Реактивы

1) 0,1 М фосфатный буфер, рН 7,4; 2) 0,04% раствор бромтимолового синего; 3) раствор субстрата аспартатаминотрансферазы (смесь α -кетоглутаровой и аспарагиновой кислот); 4) раствор субстрата аланинаминотрансферазы (смесь α -кетоглутаровой кислоты и аланина); 5) раствор ДНФГ в 1 М НСl; 6) 0,4 моль/л раствор NaOH; 7) 0,1 мкмоль/л раствор пирувата (эталон).

Проведение анализа

Готовят стандартную пробу и опытные пробы для определения активности ферментов АсАТ и АлАТ согласно таблице.

	1-я проба, стандартная, мл	2-я проба, опытная для АлАТ, мл	3-я проба, опытная для АсАТ, мл
Субстратный раствор АлАТ	0,25	0,25	-
Субстратный раствор АсАТ	-	-	0,25
Эталонный раствор	0,05	-	-
Сыворотка	-	0,05	0,05
	Инкубируют 60 мин при 37°C		
Раствор 2,4-ДНФГ	0,25	0,25	0,25
	Инкубируют 20 мин при 20–25 °С		
Раствор NaOH	2,5	2,5	2,5
Пробы инкубируют 10 мин при комнатной температуре, колориметрируют против контроля (фосфатный буфер) при зелёном светофильтре (500–560 нм)			

Расчёт

$$\text{Активность АлАТ, ммоль/л·час} = \frac{E_{\text{оп2}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}}$$

$$\text{Активность АсАТ, ммоль/л·час} = \frac{E_{\text{оп3}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}}$$

где: $E_{\text{ст}}$, $E_{\text{оп2}}$, $E_{\text{оп3}}$ – оптическая плотность стандартной и опытных проб (для АлАТ и АсАТ соответственно), $C_{\text{ст}}$ – концентрация стандартного раствора.

Нормальные величины

Сыворотка: активность АлАТ	0,1–0,68 ммоль/л·час
активность АсАТ	0,1–0,45 ммоль/л·час
Коэффициент де Ритиса (АсАТ/АлАТ)	1,33±0,40

Клинико-диагностическое значение

Определение активности АсАТ, АлАТ и их соотношения используют для выявления патологических процессов различных органов. В миокарде выше активность АсАТ, чем АлАТ, в печени наоборот. При инфаркте миокарда значительно увеличивается активность АсАТ в сыворотке крови и коэффициент АсАТ/АлАТ. При поражении печени (цирроз, сывороточный гепатит) больше растёт активность АлАТ, коэффициент АсАТ/АлАТ снижается.

Оформление работы

Указывают принцип метода, регистрируют результаты анализа, производят расчёты и делают вывод.

Лабораторная работа 2

Определение аминокислот методом распределительной хроматографии на бумаге

Хроматографические методы применяют для сорбционно-динамического разделения смеси аминокислот, белков, углеводов, липидов и их метаболитов. Существует несколько видов хроматографии. Довольно точен и доступен метод распределительной хроматографии на бумаге (модификация адсорбционной хроматографии), где в качестве адсорбента используют специальную фильтровальную бумагу. Хроматографию проводят в закрытой камере, чтобы избежать испарения растворителей хроматографической смеси.

Разделение смеси аминокислот методом распределительной хроматографии на бумаге используют для оценки аминокислотного состава белков, качественного и количественного определения аминокислот в биологических жидкостях и тканях. В научных лабораториях применяют автоматические анализаторы аминокислот с высокой чувствительностью и скоростью проведения анализа.

Принцип

Отдельные аминокислоты обладают различной растворимостью в двух частично смешивающихся жидкостях, одной из которых является вода, другой – водонасыщенный органический растворитель, например, бутанол. Из двух частично смешивающихся жидкостей один растворитель должен быть полярным

(неподвижная фаза), а другой неполярным – подвижная фаза. Более гидрофобная аминокислота, лучше растворяющаяся в неполярном растворителе, движется с большей скоростью от линии старта, чем гидрофильная аминокислота. В результате этого отдельные аминокислоты по окончании хроматографического разделения оказываются на разном расстоянии от линии старта.

Радиальную хроматографию проводят на бумаге, используя в качестве хроматографической камеры чашку Петри. Растворитель перемещается от центра к периферии, захватывая аминокислоты, которые распределяются концентрическими кругами и обнаруживаются после высушивания бумаги и проведения нингидриновой реакции.

Реактивы

1) 0,04 моль/л растворы аминокислот: глицина, аланина, лейцина, 2) хроматографическая смесь (бутанол:уксусная кислота:вода в соотношении 1,5:1,5:1,0), 3) 0,2% спиртовой раствор нингидрина, 4) задача – смесь растворов определяемых аминокислот.

Оборудование

Сушильный шкаф 100°C (электроплита), пульверизатор, чашки Петри, хроматографическая бумага (d=12 см), стеклянные капилляры (микропипетка).

Проведение анализа

Диск бумаги следует держать за края, чтобы избежать появления отпечатков пальцев на хроматограмме.

- 1) Диск хроматографической бумаги делят на 4 сектора, которые маркируют согласно исходным растворам. В центре хроматограммы делают отверстие диаметром около 0,2 см и вставляют фитиль из скрученной полоски бумаги с высотой равной высоте чашки Петри.
- 2) На расстоянии 1,0 см от центра карандашом отмечают линию старта, на которую в соответствующих секторах стеклянными капиллярами или микропипеткой наносят растворы аминокислот-«свидетелей», исследуемую смесь.
- 3) Диск с хроматограммой сушат на воздухе до исчезновения влажных пятен.
- 4) Хроматограмму помещают в хроматографическую камеру (чашку Петри), на 1/3 заполненную хроматографической смесью. Разделение проводят при комнатной температуре под визуальным контролем (около 30 мин).
- 5) Когда фронт растворителя достигнет границ бумажного диска, разделение прекращают и сразу же отмечают карандашом по всей окружности линию фронта растворителя.
- 6) Хроматограмму высушивают в сушильном шкафу при температуре 90–100°C (или прогревают над электроплитой) с целью устранения растворителей и фиксации аминокислот.
- 7) Хроматограмму опрыскивают раствором нингидрина с помощью пульверизатора и помещают в сушильный шкаф при 100°C (или прогревают над электроплитой). На бумаге проявляются красноватые, пурпурно-красные, чаще – сине-фиолетовые пятна, соответствующие расположению различных аминокислот.

Реактивы

10,0% раствор FeCl₃.

Материал для исследования

Моча.

Проведение анализа

В пробирку вносят 10 капель мочи, 5 капель FeCl₃. При наличии в моче фенилпирувата через 2–3 мин появляется оливково-зеленое окрашивание раствора.

Нормальные величины

Плазма крови до 1 месяца	75–100 мкмоль/л
от 2 мес до 14 лет	25–75 мкмоль/л
Моча до 1 года	6–24 мкмоль/сут
до 14 лет	6–72 мкмоль/сут

Практическое значение

Фенилкетонурия или фенилпировиноградная олигофрения (слабоумие) связана с врожденным отсутствием в печени фенилаланин-гидроксилазы и нарушением превращения фенилаланина в тирозин, в крови и моче появляются фенилпируват и фенилаланин. Положительную реакцию Феллинга моча даёт обычно после года жизни. До года тест бывает положительным эпизодически (на максимуме выведения фенилкетонов), при подозрении на фенилкетонурию его повторяют неоднократно. В крови растёт концентрация фенилаланина в десятки раз (до 600–2400 мкмоль/л), в моче до 3–12 мкмоль/сут. Фенилпируват появляется в моче при поражениях печени (вирусный гепатит, отравление ядами).

Оформление работы

Указывают принцип метода, записывают результаты анализа, делают заключение о наличии/отсутствии патологии, отмечают практическую значимость.

Вопросы для самоконтроля

1. Транспорт аминокислот через клеточные мембраны.
2. Судьба всосавшихся в кровь аминокислот.
3. Основные реакции внутриклеточного обмена аминокислот (окислительное дезаминирование, трансаминирование, декарбоксилирование), их механизм, ферменты и коферменты, продукты, значение.
4. Реакции образования биогенных аминов, биологическая роль, реакции инактивации, участие коферментов.
5. Особенности обмена отдельных аминокислот: глицина, серина, метионина, цистеина, фенилаланина, тирозина, триптофана, дикарбоновых аминокислот.
6. Основные пути возникновения патологий азотистого обмена.

3. ОБЕЗВРЕЖИВАНИЕ АММИАКА В ОРГАНИЗМЕ

Актуальность

Аммиак является высокотоксичным веществом. При катаболизме аминокислот (70 г в сутки) и окислении биогенных аминов образуется большое количество

NH_3 , но его уровень в крови не превышает 60 мкмоль/л (3 ммоль/л для кроликов – летальная доза). Основной транспортной связанной формой аммиака служит глутамин, при повышении концентрации аммиака дополнительно активируется синтез аспарагина, в транспорте аминного азота мышц участвует аланин. NH_3 связывается в тканях с образованием нетоксичных соединений, выделяемых с мочой – мочевины, соли аммония, креатинин. Из состава транспортных форм NH_3 может быть направлен на синтез азотистых оснований, при катаболизме которых он образуется снова и выводится из организма в виде конечных продуктов распада, в том числе мочевой кислоты. В клинике часто выявляются нарушения процессов нейтрализации NH_3 .

Цель

1. Изучить основные формы транспорта аммиака, пути получения и утилизации аммиака в реакциях обмена и пути обезвреживания аммиака с образованием и выведением конечных продуктов белкового обмена.
2. Научиться определять концентрацию мочевины в сыворотке крови и моче.

Вопросы для самоподготовки

1. Основные пути образования аммиака. Источники аммиака в тканях.
2. Токсичность аммиака, влияние на мозг, клеточное дыхание и торможение цикла трикарбоновых кислот. Влияние аммиака на организм при избыточном белковом питании.
3. Пути связывания аммиака в организме. Пути, нацеленные на детоксикацию аммиака и выведение из организма конечных продуктов азотистого обмена. Пути использования аммиака для синтеза необходимых организму метаболитов с последующим выведением N-содержащих продуктов их распада.
4. Механизм синтеза глутамина, роль в транспорте аммиака. Роль аланина в транспорте аминного азота работающих мышц в печень (аланиновый цикл).
5. Орнитиновый цикл мочевинообразования, связь с циклом Кребса, источники аммиака для синтеза.
6. Аммонийогенез в почках. Значение для организма.
7. Образование креатина, креатинина. Локализация реакций синтеза, роль метионина. Роль креатинфосфокиназы и креатинфосфата для мышечной ткани.
8. Возможные механизмы нарушения образования конечных продуктов белкового обмена.
9. Клинико-диагностическое значение определения мочевины, креатинина в сыворотке крови и моче.

Лабораторная работа 1

Определение содержания мочевины в сыворотке крови и моче

ДИАЦЕТИЛМОНООКСИМНЫЙ МЕТОД

Принцип

Мочевина в кислой среде при нагревании образует с диацетилмонооксимом в присутствии тиосемикарбазида и солей железа комплекс красного (розово-красного) цвета. Интенсивность окраски пропорциональна уровню мочевины.

Реактивы

1) 10% раствор трихлоруксусной кислоты, 2) стандартный раствор мочевины (16,65 ммоль/л), 3) рабочий раствор (смесь FeCl₃, диацетилмонооксима, тиосемикарбазида, ортофосфорной кислоты и концентрированной H₂SO₄).

Материал для исследования

Сыворотка крови, моча (разведение 1:50)

Проведение анализа

Готовят стандартную пробу и опытные пробы для определения концентрации мочевины в сыворотке крови и моче согласно таблице.

	Опыт 1, мл	Опыт 2, мл	Стандарт, мл
Сыворотка	0,01	–	–
Моча	–	0,01	–
Стандарт мочевины	–	–	0,01
Рабочий реактив	2,0	2,0	2,0
Пробы перемешивают, закрывают фольгой, инкубируют 20 мин в кипящей водяной бане, охлаждают под проточной водой. Не позже, чем через 15 мин, измеряют оптическую плотность проб против воды при длине волны 530–560 нм (зелёный светофильтр) в кювете 1,0 см.			

Расчёт

$$\text{Мочевина сыворотки крови [ммоль/л]} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}}$$

$$\text{Мочевина мочи [ммоль/л]} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}} \times 50$$

где: E_{оп} – оптическая плотность пробы, E_{ст} – оптическая плотность стандарта, C_{ст} – концентрация стандартного раствора, 50 – разведение мочи.

Нормальные величины

Сыворотка 2,5–8,3 ммоль/л
Моча 330–580 ммоль/сут

ЭКСПРЕСС МЕТОД С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИНДИКАТОРНЫХ ПОЛОСОК

Принцип

Мочевина под действием фермента уреазы (класс гидролаз, оптимум pH 7,0–7,2) разлагается с образованием аммиака, который окрашивает желтую полоску реактивной хроматографической бумаги в голубовато-зеленоватый цвет. Высота окрашенной зоны пропорциональна концентрации мочевины.

Реактивы

Индикаторная бумага «Уреатест» или «Уранал».

Материал для исследования

Сыворотка крови

Проведение анализа

Конец хроматографической полоски, пропитанной ферментом, погружают в сыворотку крови (не смачивая красной полоски – зона раздела). Бумажку помещают в сухую пробирку, закрывают пробкой, оставляют на 30 минут при 37 °С в термостате/водяной бане. Измеряют высоту (в мм) индикаторной зоны, окрашенной в голубовато-зеленоватый цвет, сравнивают её со шкалой.

Высота окрашенной зоны	Содержание мочевины
до 1 мм	нормальное
2–3 мм	слегка повышенное
3–5 мм	повышенное
выше 5 мм	сильно повышенное

Практическое значение

Уровень мочевины в сыворотке крови зависит от скорости её синтеза в печени, выделения почками и от величины белкового катаболизма. Повышение уровня мочевины: при заболеваниях почек (нарушении выделительной функции), нарушении почечной перфузии (застойная сердечная недостаточность), истощении запасов воды (рвота, понос), повышенном катаболизме белка, при диете с высоким содержанием белка. Снижение: при диете с низким содержанием белка, повышенной утилизации белка в тканях (поздние сроки беременности), тяжёлых заболеваниях печени, сопровождающихся нарушением синтеза мочевины (паренхиматозная желтуха, гепатиты, цирроз печени).

Оформление работы

Указывают принцип метода, регистрируют данные, делают расчеты, сравнивают полученные результаты с нормальными значениями, формулируют вывод о наличии/отсутствии патологических отклонений, о возможных заболеваниях пациента, отмечают практическую значимость метода.

Вопросы для самоконтроля

1. Пути образования и связывания аммиака в реакциях обмена веществ. Токсичность аммиака для организма.
2. Транспортные формы аммиака. Доставка к местам протекания реакций биосинтеза и к местам выведения. Роль аланинового цикла в удалении аминного азота из работающей мышцы.
3. Аммиак и аминокислоты, значение обмена глутамата в нервной ткани.
4. Механизмы синтеза глутамина, мочевины, солей аммония, креатина и креатинина, локализация синтезов, ферменты и коферменты, энергетика.
5. Органная локализация образования и выведения конечных продуктов азотистого обмена, возможные причины нарушения процессов обмена и выведения при различных патологических состояниях.

Тестовые задания

Выбрать один правильный ответ.

1. БИОЛОГИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ БЕЛКОВ ОБУСЛОВЛЕНА

- 1) порядком чередования аминокислот в молекуле белка
- 2) аминокислотным составом
- 3) молекулярной массой белков
- 4) зарядом белковой молекулы
- 5) включением небелковых компонентов

2. ДЛЯ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ ТОКСИЧНЫХ ВЕЩЕСТВ, ОБРАЗУЮЩИХСЯ В ТОЛСТОМ КИШЕЧНИКЕ, В ПЕЧЕНИ ПРИСУТСТВУЕТ ФЕРМЕНТ

- 1) гексокиназа
- 2) аминотрансфераза
- 3) глюкуронилтрансфераза
- 4) сахараза
- 5) аденозиндезаминаза

3. ЭНТЕРОПЕПТИДАЗА ЯВЛЯЕТСЯ АКТИВАТОРОМ ФЕРМЕНТА

- 1) пепсиноген
- 2) трипсиноген
- 3) химотрипсиноген
- 4) проэластаза
- 5) проаминопептидаза

4. АКТИВНЫЙ ФЕРМЕНТ ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗА СОДЕРЖИТ

- 1) никотинамидадениндинуклеотид (НАД⁺)
- 2) флавинадениндинуклеотид (ФАД)
- 3) флавинмононуклеотид (ФМН)
- 4) пиридоксальфосфат (ПАЛФ)
- 5) пиридоксаминфосфат (ПАМФ)

5. СЕРОТОНИН В РЕАКЦИИ ДЕКАРБОКСИЛИРОВАНИЯ ОБРАЗУЕТСЯ ИЗ

- 1) гистидина
- 2) триптофана
- 3) тирозина
- 4) 5-гидрокситриптофана
- 5) 5-гидроксилизина

6. ОБРАЗОВАНИЕ γ -АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ КАТАЛИЗИРУЕТ

- 1) гистидиндекарбоксилаза
- 2) тирозинмонооксигеназа
- 3) глутаматдекарбоксилаза
- 4) орнитиндекарбоксилаза
- 5) триптофандекарбоксилаза

7. В СОСТАВ АМИНОТРАНСФЕРАЗ ВХОДИТ КОФЕРМЕНТ

- 1) никотинамидадениндинуклеотид
- 2) флавинадениндинуклеотид
- 3) тиаминдифосфат
- 4) пиридоксальфосфат
- 5) никотинамидадениндинуклеотид фосфорилированный

8. СИНТЕЗ СОЛЯНОЙ КИСЛОТЫ В ЖЕЛУДКЕ СТИМУЛИРУЕТСЯ

- 1) тирамином
- 2) гистамином
- 3) дофамином
- 4) триптамином
- 5) ГАМК

9. ПРИ ГИПОВИТАМИНОЗЕ НАРУШЕН ОБМЕН АМИНОКИСЛОТЫ

- 1) тирозина
- 2) лейцина
- 3) метионина
- 4) цистеина
- 5) изолейцина

10. СВЯЗЫВАНИЕ АММИАКА ПРОИСХОДИТ ПРИ

- 1) синтезе глутамата из альфа-кетоглутарата
- 2) синтезе креатина
- 3) трансаминировании аланина
- 4) синтезе серотонина
- 5) переаминировании аспартата

Ситуационные задачи

Ответы подробно пояснить.

1. Больного беспокоят боли в области желудка, отрыжка с неприятным запахом «тухлых яиц», урчание и газообразование в кишечнике.
Указать, какие процессы могут быть причиной появления такого запаха. Дать рекомендации для нормализации процессов пищеварения.
2. У ребёнка содержание в крови фенилаланина 5 мкмоль/л при норме 0,2 мкмоль/л, он выделяется в большом количестве с мочой.
Пояснить, какие процессы обмена нарушены, как называется заболевание и как вскармливать ребёнка.

ТЕМА 10. ОБМЕН НУКЛЕОТИДОВ И НУКЛЕОПРОТЕИНОВ. БИОСИНТЕЗ БЕЛКА И ЕГО РЕГУЛЯЦИЯ

1. ОБМЕН НУКЛЕОТИДОВ, НУКЛЕОПРОТЕИНОВ

Актуальность

Существуют два типа нуклеопротеинов: дезоксирибонуклеопротеины (ДНП) и рибонуклеопротеины (РНП). Они играют важную роль в хранении и реализации наследственной информации. Белковые компоненты нуклеопротеинов подвергаются превращениям, свойственным всем белкам. Нуклеиновые кислоты не являются незаменимыми пищевыми факторами, и практически все клетки организма способны к синтезу нуклеотидов. Скоростью синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов определяется синтез нуклеиновых кислот. К заболеваниям, связанным с патологией обмена нуклеопротеинов, относятся подагра, мочекаменная болезнь, синдром Леша-Нихана, оротацидурия, мегалобластическая анемия и другие. Нуклеотиды – лекарственные препараты, которые успешно применяются в клинике с лечебной целью.

Помимо роли структурных компонентов нуклеиновых кислот мононуклеотиды могут выполнять иные важные функции:

- 1) цикл АДФ-АТФ участвует в трансформации энергии окисления веществ в энергию, используемую в эндогенных процессах организма;
- 2) адениловая кислота входит в состав коферментов дегидрогеназ (НАД, НАДФ, ФАД) и кофермента ацилирования (КоА); УТФ, ГТФ и ЦТФ играют роль коферментов в реакциях переноса моносахаридных остатков; ЦТФ служит коферментом холинтрансферазы;
- 3) циклические нуклеотиды 3'5'-цАМФ и 3'5'-цГМФ являются посредниками при передаче гормональных и иных сигналов на внутриклеточные эффекторные системы.

Цель

1. Знакомство с биосинтезом и катаболизмом пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, процессами репликации ДНК.
2. Освоение методов количественного определения мочевой кислоты в сыворотке крови и моче.

Вопросы для самоподготовки

1. Переваривание нуклеопротеинов и васывание продуктов их распада в желудочно-кишечном тракте. Катаболизм нуклеиновых кислот в клетке.
2. Реакция образования 5-фосфорибозиламина, источники атомов азота и углерода пуринового кольца при синтезе ИМФ. Основные этапы синтеза АМФ, ГМФ из ИМФ, превращение нуклеозидмонофосфатов в трифосфаты.
3. Реакции синтеза УМФ и ЦМФ, превращение их в трифосфаты, нарушение метаболизма пиримидинов при оротацидурии.
4. Образование дезоксирибонуклеотидов, роль тиоредоксина и НАДФН в этом процессе, связь с фазами клеточного цикла.
5. Синтез дТМФ, ферменты, катализирующие процесс, роль метилен-ТГФК.

6. Регуляция синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов по типу обратной связи, её особенности.
7. Реакции образования мочевой кислоты из АМФ и ГМФ, содержание мочевой кислоты в крови и моче.
8. Молекулярные механизмы развития мочекаменной болезни, синдрома Леша-Нихана, подагры. Диета при гиперурикемии, причины эффективности аллопуринола при лечении подагры.
9. Распад пиримидиновых нуклеотидов, конечные продукты процесса, их утилизация и судьба. Отличительные особенности распада пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов.
10. Ингибиторы синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Нуклеотиды – лекарственные препараты.
11. Нуклеотидные коферменты, представление об их образовании. Нуклеотиды как активаторы метаболитов в реакциях обмена веществ.
12. Биосинтез ДНК: суммарное уравнение репликации, система синтеза ДНК, ориджин репликации, ферменты репликации, основные этапы и особенности репликации на разных нитях ДНК, ошибки и репарация ДНК.
13. Связь биосинтеза ДНК с фазами клеточного цикла. Локализация синтеза ДНК в клетке: ядро и митохондрии. Синтез ДНК при репликации и феномен обратной транскрипции. Теломераза.
14. Созревание молекул ДНК (смысл метилирования нуклеотидов и др.). Организация нуклеопротеинов при формировании хромосом, взаимодействие ДНК с гистонами, механизмы упаковки в хромосомы.

Самостоятельная работа

Заполнить в таблице матричных биосинтезов столбец «Репликация».

Процесс	Репликация	Транскрипция	Трансляция
Субстраты			
Источники энергии			
Ферменты			
Кофакторы			
Направление синтеза новых цепей			
Локализация процесса			
Характеристика продукта			

Лабораторная работа 1

Определение содержания мочевой кислоты в сыворотке крови и моче

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ МЕТОД (ОЦЕНКА В КРОВИ И МОЧЕ)

Принцип

Мочевая кислота с помощью уриказы окисляется до аллантаина и CO_2 с образованием пероксида водорода. Пероксид водорода в присутствии пероксидазы окисляет хромогены (3,5-дихлор-2-гидроксибензолсульфонат натрия (ДХГБС), краситель 4-аминоантипирин) в окрашенное соединение (красный квинон). Интенсивность окраски пропорциональна содержанию мочевой кислоты в пробе.

Материал для исследования

Сыворотка крови, моча (разбавленная в 5 раз дистиллированной водой).

Реактивы

1) Рабочий реагент (уриказа, пероксидаза, 4-аминоантипирин, ДХГБС, калий железосинеродистый, ЭДТА в боратном буфере), 2) 500 мкмоль/л раствор мочевиной кислоты (стандарт).

Проведение анализа

	Опыт 1, мкл	Опыт 2, мкл	Стандарт, мкл
Сыворотка крови	50	–	–
Моча	–	50	–
Стандарт мочевиной кислоты	–	–	50
Рабочий реагент	2000	2000	2000
	Инкубируют 10 мин при 37°C, измеряют экстинкцию стандарта и опытных проб против рабочего реагента при длине волны 520 (500–540) нм.		

Расчёт

Содержание мочевиной кислоты в сыворотке: $C[\text{мкмоль/л}] = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}}$

Содержание мочевиной кислоты в моче: $C[\text{мкмоль}/(\text{л} \times \text{сут})] = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}} \times 5 \times V : 1000$

где $E_{\text{оп}}$ – оптическая плотность пробы, $E_{\text{ст}}$ – оптическая плотность стандарта, $C_{\text{ст}}$ – концентрация стандарта (калибратор), V – объём суточной мочи (л), 5 – коэффициент разведения мочи, 1000 – пересчёт мкмоль в ммоль.

Нормальные величины

Сыворотка и плазма крови

женщины 150–310 мкмоль/л

мужчины 230–500 мкмоль/л

Моча 1,5–4,5 ммоль/сут

ТИТРОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД (ОЦЕНКА В МОЧЕ)

Принцип

Мочевая кислота восстанавливает фосфорно-вольфрамовый реагент с развитием синей окраски, интенсивность которой пропорциональна содержанию мочевиной кислоты. Количество образовавшейся фосфорно-вольфрамовой сини определяют титрованием гексацианоферратом калия, который окисляет фосфорно-вольфрамовую синь и окраска исчезает.

Реактивы

1) 20% раствор Na_2CO_3 , 2) фосфорно-вольфрамовый реагент, 3) 3,992 моль/л раствор гексацианоферрата калия $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

Материал для исследования

Моча.

Проведение анализа

В колбу наливают 5 мл мочи, добавляют 2 мл фосфорно-вольфрамового реактива и 10 мл раствора Na_2CO_3 , перемешивают. Используя мерную пипетку на 10 мл с фингером или штатив с бюреткой, по каплям (осторожно!) приливают раствор $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ до исчезновения синего окрашивания и фиксируют объём, пошедший на титрование.

Расчёт

$$C_{\text{оп}} = \frac{C_{\text{ст}} \times A \times D}{B}$$

где $C_{\text{оп}}$ – содержание мочевой кислоты в пробе, $C_{\text{ст}}$ – содержание мочевой кислоты в стандартном растворе (соответствует 1 мл раствора $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ – 0,004 моль), B – анализируемый объём мочи, A – объём пошедшего на титрование р-ра $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (мл), D – суточный диурез (1200–1500 мл).

Практическое значение

Содержание мочевой кислоты в крови (мононатриевая соль в комплексе с белком) определяется интенсивностью её синтеза организмом и выделением с мочой. Повышение содержания мочевой кислоты (гиперурикемия) наблюдается при уменьшении выведения её почками или избыточном образовании при всех заболеваниях, связанных с распадом нуклеопротеинов (лейкозы, лечение цитостатиками, облучение). У таких больных отмечается образование мочевых камней. Гиперурикемия является главным симптомом подагры, когда мочевая кислота откладывается в тканях, суставных сумках, хрящах, сухожилиях, а суточное количество в моче снижается. Белки сыворотки стабилизируют ураты, но при снижении рН мочевая кислота кристаллизуется в тканях. Гиперурикемия является компонентом метаболического X-синдрома. Гипоурикемия отмечается при анемии, приеме салицилатов, кортикотропина.

Гиперурикурия (увеличение экскреции уратов) наступает при воздействии солей лития. Гипоурикурия (уменьшение экскреции мочевой кислоты) может быть следствием отравления солями тяжёлых металлов, заболеваний почек, употребления алкоголя.

Оформление работы

Указывают принцип метода, регистрируют результаты, делают расчёты, сравнивают полученные данные с нормальными значениями, формулируют вывод о наличии/отсутствии патологических отклонений, отмечают практическую значимость работы.

Вопросы для самоконтроля

1. Превращение нуклеопротеинов в желудочно-кишечном тракте, в клетках организма.
2. Биосинтез пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, дезоксирибонуклеотидов и регуляция этих процессов.
3. Распад пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Сравнение молекул – источников атомов для синтеза азотистых оснований и конечных продуктов их распада. Мочевая кислота, роль в организме, подагра.

4. Значение нуклеотидов в процессах обмена веществ. Роль нуклеотидов в биосинтезе нуклеиновых кислот.
5. Хранение информации о белке, генетический код, принципы синтеза ДНК. Механизмы и ферменты репликации, исправление ошибок, теломераза, созревание и упаковка ДНК.

2. БИОСИНТЕЗ БЕЛКА И ЕГО РЕГУЛЯЦИЯ

Актуальность

Белки клетки находятся в состоянии динамического равновесия, то есть непрерывно обновляются. Знание механизмов матричных биосинтезов, способных считывать и реализовать генетическую информацию о белке, принципов их регуляции необходимо для понимания молекулярных основ возникновения наследственных заболеваний, а также рационального использования химиотерапевтических средств.

Цель

1. Изучить основные этапы биосинтеза белка и механизмы его регуляции.
2. Освоить методы определения количества белка в растворе.
3. Познакомиться с современными методами лабораторной диагностики по оценке экспрессии генов.

Вопросы для самоподготовки

1. Строение транскриптона ДНК, экзоны и интроны. Генетический код, его свойства.
2. Этапы и ферменты транскрипции. Кэпирование, полиаденилирование, процессинг матричной РНК. Особенности процессинга транспортной и рибосомальной РНК.
3. Основные компоненты белоксинтезирующей системы.
4. Адапторная роль транспортной РНК. Синтез аминоацил-тРНК, специфичность аминоацил-тРНКсинтетазы.
5. Строение и функционирование рибосом. Последовательность реакций при синтезе полипептидной цепи.
6. Регуляция биосинтеза белка путем индукции и репрессии (схема Жакоба-Моно).
7. Посттрансляционная модификация белковых молекул. Значение.
8. Возможность нематричного образования пептидной связи, ферменты и значение при синтезе важнейших пептидов (на примере синтеза/распада глутатиона в процессе транспорта аминокислот в клетку).
9. Лекарственные препараты – активаторы и ингибиторы матричных биосинтезов.
10. Современные методы оценки экспрессии генов (ИФА, ПЦР и другие).

Темы для реферативных сообщений

1. Иммуноферментный анализ (ИФА), пути практического использования.
2. Полимеразная цепная реакция. Методы на основе ПЦР. Преимущества

ПЦР-диагностики.

3. Значение ИФА и ПЦР-диагностики для выявления вирусных заболеваний, синдрома приобретенного иммунодефицита человека.
4. Нанотехнологии в клинической биохимии и создании современных лабораторных диагностикумов.
5. Нанотехнологии в выявлении антител к нормальным и патологическим липопротеинам при диагностике атеросклероза, ишемической болезни сердца.
6. РНК-зависимая ДНК-полимеразная активность. Теломераза.
7. Полноценное белковое питание и здоровье зубов и пародонта.
8. Характерные нарушения при белковом голодании и болезни «квашиноркор».
9. Основные нарушения обмена нуклеопротеинов.
10. Протеасомы и шапероны в жизни белка.
11. Использование генной инженерии и ДНК-технологий при синтезе лекарств.

Самостоятельная работа

Заполнить оставшиеся столбцы таблицы – «Транскрипция» и «Трансляция».

Процесс	Репликация	Транскрипция	Трансляция
Субстраты			
Источники энергии			
Ферменты			
Кофакторы			
Направление синтеза новых цепей			
Локализация процесса			
Характеристика продукта			

Лабораторная работа 1

Определение содержания общего белка в сыворотке крови

Концентрация общего белка в сыворотке крови достаточно стабильна. Увеличение содержания общего белка в крови называют гиперпротеинемией, снижение – гипопропротеинемией, однако чаще наблюдается дисбаланс в соотношении белков сыворотки при сохранении их общего количества – диспротеинемия.

Изменения концентрации общего белка в сыворотке крови могут иметь абсолютный или относительный характер. Изменения абсолютного характера – следствие колебаний содержания белка в крови. Относительные изменения показателя зависят от объёма крови, то есть возникают при обезвоживании или гипергидратации организма.

Материал для исследования

Сыворотка крови.

Принцип

Микробиуретовый метод основан на способности белков и пептидов в щелочной среде формировать с медью фиолетовый или красно-фиолетовый комплекс, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию белка.

Реактивы

1) Биуретовый реактив (смесь сульфата меди (II) и натрия гидроксида), 2) эталонный раствор альбумина (70 г/л).

Проведение анализа

	Опыт,	Стандарт, мл
Сыворотка	0,04	-
Раствор альбумина	-	0,04
Биуретовый реактив	3,0	3,0
Инкубируют пробы 10 мин и измеряют оптическую плотность против дистиллированной воды в кювете 0,5 см, при длине волны 540–560 нм.		

Расчёт

$$\text{Общий белок [г/л]} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \cdot C_{\text{ст}},$$

где: $E_{\text{оп}}$ и $E_{\text{ст}}$ – оптическая плотность опытной и стандартной проб,
 $C_{\text{ст}}$ – концентрация белка в стандартной пробе.

Нормальные величины

Сыворотка крови 63–85 г/л

Клинико-диагностическое значение

Изменения концентрации общего белка могут быть абсолютными и относительными. Изменения абсолютного характера являются следствием колебаний содержания белка в крови. Относительные изменения зависят от объёма крови. Гипопротеинемия чаще всего связана с уменьшением фракции альбуминов. *Истинная (абсолютная) гипопротеинемия*: недостаточное потребление белка с пищей (заболевания пищеварительного тракта, сужение пищевода опухолью, недоедание, голодание); снижение синтеза белка (дисбаланс белков пищи, хронические паренхиматозные гепатиты, интоксикации, злокачественные опухоли, лечение кортикостероидами); усиленный распад белка (кахексия, тяжёлые инфекции, длительные воспалительные процессы, лихорадочные состояния, тиреотоксикоз), потеря белка (нарушения проницаемости капилляров, кровоизлияния, ожоги, острые и хронические кровотечения). *Относительная гипопротеинемия*: гипергидратация (нарушения водного баланса). *Истинная гиперпротеинемия*: острые инфекции (увеличение синтеза белков острой фазы), хронические процессы (активация иммунной системы с развитием γ -глобулинемии) – миеломная болезнь, лимфогрануломатоз, саркоидоз. *Относительная гиперпротеинемия*: обезвоживание с потерей внутрисосудистой жидкости при профузных поносах (холера и др.), усиленном потоотделении, неукротимой рвоте, несахарном диабете, тяжёлых обширных ожогах, генерализованных перитонитах.

Оформление работы

Указывают принцип метода, регистрируют показания приборов, делают расчёт.

Сравнивают полученные данные с нормальными величинами, делают вывод по возможным заболеваниям.

Лабораторная работа 2

Современные методы оценки экспрессии генов (теоретически)

В современном мире интенсивно развиваются ДНК-технологии (наиболее известен ПЦР-анализ) и иммунобиохимические методы, используемые при изучении фундаментальных проблем протеомики, метаболомики, иммунологии, эндокринологии, генетики и при решении практических задач медицины, требующих точной оценки экспрессии белков, содержания биологически активных веществ или идентификации возбудителя заболевания. Использование современных методов требует наличия в лабораториях специальной аппаратуры и строгого соблюдения технологических процессов, что не всегда возможно воспроизвести в условиях учебных аудиторий. Однако базовые знания передовых биомедицинских технологий необходимы современному специалисту, поэтому на практических занятиях предоставлена возможность ознакомиться с основами наиболее актуальных методов. К максимально востребованным относится иммуноферментный анализ (ИФА) – это одновременно фотокolorиметрический и иммунохимический метод. Использование ИФА-тест-систем в практическом здравоохранении способствует разностороннему системному подходу к обследованию пациента на этапах установления диагноза, уточнения молекулярных механизмов и динамики заболевания, проверки эффективности лечения.

1) ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ

Иммуноферментный анализ (англ. – Enzyme Immuno Assay (EIA), Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA)) чаще всего применяют в диагностических целях при идентификации специфических белковых молекул или их фрагментов, характерных для определённой патологии, а также при выявлении в крови специфических антител к возбудителю подозреваемой патологии. Разработаны варианты анализа, основанные на выявлении как антигенов, так и антител. Чувствительность метода ИФА имеет ограничения.

Этапы проведения анализа

I Этап – подготовительный. Для анализа используют специальные планшеты из полистирола, с круглыми плоскодонными лунками, вместимостью около 300 мкл. На планшете 96 лунок (8 рядов по 12 лунок). Перед анализом планшету сенсибилизируют, нанося раствор антигена. Обычно это не целая структура возбудителя, а часть (наиболее характерная) белков его оболочки. Антигены для ИФА часто получают генно-инженерными технологиями на трансгенных *E. Coli*. Растворимые антигены из раствора закрепляются на поверхности планшеты путём специфических взаимодействий. Затем для снижения помех участки незанятой антигеном поверхности «укрывают» нанесением раствора бычьего сывороточного альбумина. Несвязанный материал удаляют, планшету сушат. Сенсибилизированные планшеты хранят не более 2 недель при -18°C .

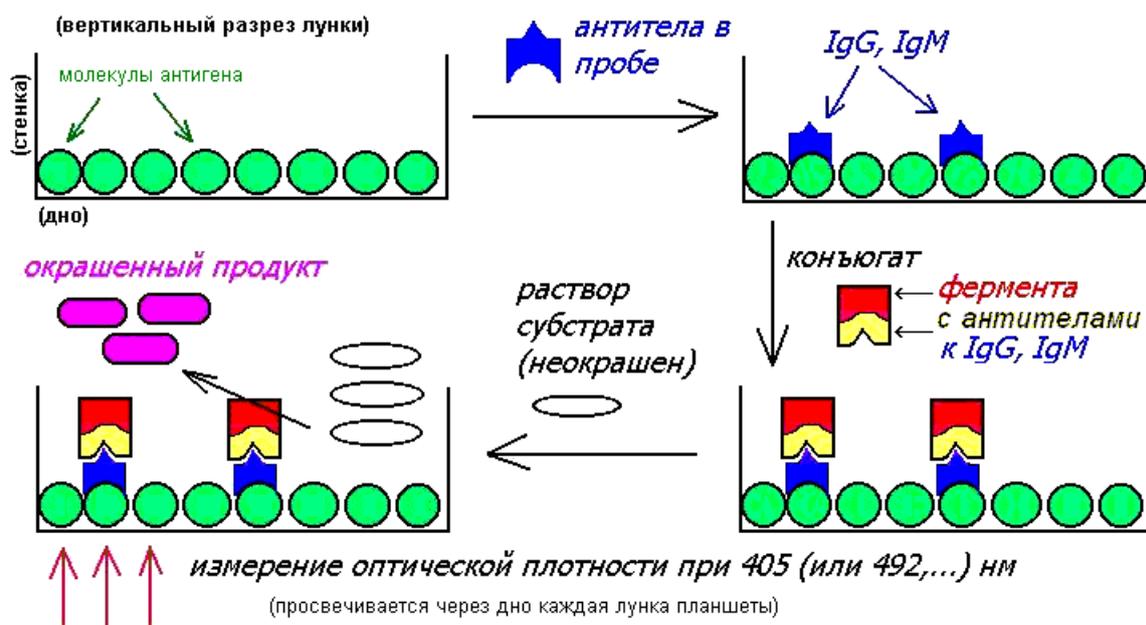


Схема процедуры проведения иммуноферментного анализа

Далее в несколько этапов выполняют непосредственно саму процедуру анализа.

II Этап. Лунки заполняют исследуемым материалом (сыворотка крови), нанося его в разные лунки с дробным разбавлением (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 и т.д.), затем выдерживают около 30 мин для связывания. Если в образцах имеются антитела, комплементарные нанесенному антигену, они образуют с ним прочные комплексы. После удаления образцов лунки 3-кратно промывают буфером для удаления остатков несвязавшегося материала.

III Этап. Далее лунки заполняют раствором конъюгата, представляющего собой молекулы белка-фермента (чаще всего пероксидаза хрена или щелочная фосфатаза), связанные посредством глутарового альдегида с молекулами вторичных антител (это антитела против антител к возбудителю, их получают из сыворотки кролика или другого вида животных при введении в его кровь антител человека к искомому возбудителю). Молекулы конъюгата соединяются в лунке с осевшими на антигене антителами из испытуемого образца. На протяжении реакции комплементарного связывания дают определённое время, после чего избыток раствора конъюгата удаляют и лунки промывают буфером.

IV Этап. Лунки заполняют раствором субстрата, который в течение 1 ч превращается в окрашенный продукт под действием конъюгированного фермента. Реакцию останавливают добавлением кислоты. Чувствительность ИФА высока благодаря «усилению сигнала» на конъюгированном ферменте. Каждая молекула исследуемого антитела связывает 1 молекулу фермента, катализирующую превращение десятков и сотен тысяч молекул субстрата в цветной продукт. Субстратом для конъюгатов, связанных с пероксидазой хрена, является орто-фенилендиамин в смеси с H_2O_2 , в итоге получают оранжево-коричневые растворы, поглощающие свет при 492 нм. Субстратом для щелочной фосфатазы является пара-нитрофенилфосфат, который преобразуется в пара-нитрофенол, поглощающий свет при 405 нм.

V Этан. На специальном планшетном фотометре через дно просвечивают каждую лунку. По оптической плотности окраски судят о концентрации антител в исследуемой сыворотке. Количество превращённого субстрата пропорционально концентрации конъюгата и, следовательно, концентрации антител против возбудителя в исследуемом образце. В «холостых» контрольных лунках параллельно основному анализу проводят реакцию для установления порога «шумов», а для проверки специфичности реакции с антителами имеются лунки, заполненные антителами из контрольного раствора.

В ряде случаев для подтверждения отсутствия антител, наряду с процедурой ИФА, требуется проведение ПЦР-анализа. Дело в том, что в первые дни после заражения число антител к патогену в крови может оказаться настолько малым, что ИФА часто даёт так называемую серонегативную реакцию (не идентифицирует специфические антитела при имеющемся возбудителе). Например, донорскую кровь оценивают на наличие вируса СПИД, возбудителей ряда других заболеваний.

2) ДНК-ДИАГНОСТИКА ЗАБОЛЕВАНИЙ

Достижения в области биохимии и молекулярной биологии изменили возможности коррекции различных патологических процессов. Доказана взаимосвязь между изменениями структуры ДНК и рядом заболеваний. Расшифровка генов, нарушение работы которых приводит к наследственным заболеваниям, создала предпосылки для развития эффективных методов их коррекции, лечения и профилактики. На основе представлений об экспрессии генов, реализуемой в виде конкретных белков, разработаны новые способы диагностики и лечения заболеваний. С помощью генной терапии оказалось возможным встраивать полноценно работающие гены в клетки организма и восстанавливать метаболические нарушения, вызванные мутантными генами. Для выявления дефектов в структуре ДНК её нужно выделить (сначала вместе с клеткой из биологической жидкости, биоптата или культуры клеток, затем непосредственно из структуры клетки) и «наработать» в достаточном для лаборатории количестве. Гены, используемые в терапии, должны быть выделены с целью дальнейшего введения в дефектные клетки организма.

Основные методы, используемые в ДНК-диагностике заболеваний: выделение ДНК, расщепление ДНК, идентификация последовательностей ДНК, блот-гибридизация, секвенирование ДНК (установление первичной структуры фрагментов), получение рекомбинантных ДНК и их амплификация (умножение).

Полимеразная цепная реакция, ПЦР-исследования (Polymerase Chain Reaction, PCR-Assay) основаны на анализе нуклеиновых кислот, не зависят от свойств белков, позволяют проводить исследования наиболее точно и с высокой чувствительностью (с помощью ПЦР одну молекулу идентифицируемой ДНК можно обнаружить в присутствии миллионов других молекул ДНК).

Принцип метода

Методология ПЦР-исследований заключается в идентификации специфического участка молекулы ДНК с последующим его копированием (амплификацией

in vitro) с целью получения достаточного количества копий, которые можно выявить доступными методами детекции. Метод ПЦР позволяет избирательно синтезировать участки ДНК длиной от нескольких десятков до нескольких сотен пар нуклеотидов, используя в качестве матрицы любые образцы ДНК. За несколько часов можно выделить и размножить последовательность ДНК в количествах, превышающих исходные в 108 раз.

Необходимое оборудование

При ПЦР-диагностике для выделения образца ДНК или РНК используют микроцентрифугу (13000–16000 об/мин), встряхиватель типа «вортекс» и термоблок до 100 °С. Для амплификации детектируемого участка генома выделенные образцы помещают в программируемый термостат (термоциклер или амплификатор), где можно задавать температурный режим (90–95 °С, 30–50 °С, 60–70 °С), параметры времени, количество циклов. Прибор рассчитан на одновременный анализ 24–96 образцов клинического материала, из которых один положительный и один отрицательный контроль. Выбор оптимального режима работы определяется длиной и специфичностью амплифицируемого участка.

Реактивы для ПЦР-диагностики

1) Субстраты синтеза (дАТФ, дГТФ, дЦТФ, дТТФ), 2) два праймера, 3) термофильная ДНК-полимераза, 4) ионы Mg^{2+} .

Материал для исследования

Образец ДНК или РНК.

Этапы проведения анализа

Амплификация заключается в повторении циклов, представляющих собой трёхступенчатый процесс, протекающий при разных температурах. Процесс повторяется, пока не синтезируется достаточно материала для детекции.

1. *Денатурация ДНК (90–95 °С)* – разрыв слабых связей между основаниями матричной молекулы ДНК с образованием 1-цепочечных молекул.

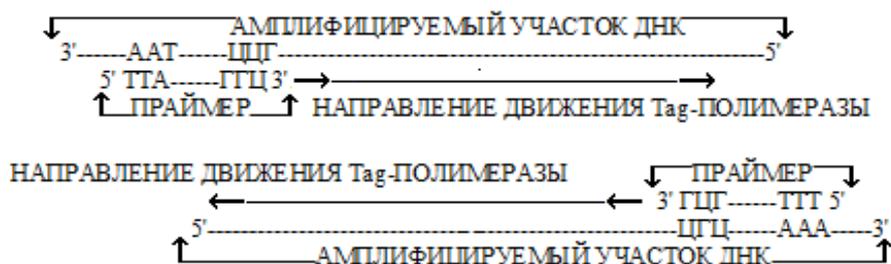


Схема гибридизации ДНК с праймерами

2. *Гибридизация ДНК с праймерами* – отжиг праймеров с комплементарными последовательностями. Специфическая гибридизация цепей ДНК с праймерами протекает при 30–60 °С. При амплификации с помощью ПЦР используют 2 олигонуклеотидных праймера (затравки), фланкирующих участок ДНК, специфичный для определяемого возбудителя. Искусственно синтезированные для ПЦР праймеры – это олигодезоксирибонуклеотиды (длиной около 20–30 остат-

ков нуклеотидов). Для синтеза праймеров необходимо знать первичную структуру (последовательность нуклеотидов) амплифицируемой области ДНК. Праймеры должны быть комплементарны 3'-концам амплифицируемого участка.

3. *Элонгация (полимеризация) ДНК* – этап достройки полинуклеотидных цепей, начиная от праймеров, с помощью ДНК-полимеразы (60-75 °С). Праймеры ориентированы так, что полимераза ведёт синтез только между ними, удваивая копии этого участка ДНК. Амплифицированный участок называют «ампликон». Количество специфического фрагмента растёт по экспоненте согласно формуле $\sim 2^n$ (n – число циклов амплификации). Один цикл идёт менее 3 мин. За 2 ч можно получить около 10^9 копий определяемого участка ДНК. Амплификация эффективна при использовании термостабильной ДНК-полимеразы (Taq-полимеразы), выделенной из *Thermus Aquaticus* – бактерий горячих источников (оптимум реакции 70–75 °С), которую не нужно заменять после каждого цикла.

Детекция (регистрация) результатов может идти по одному из двух путей.

1. *Электрофорез* с последующим флюоресцентным анализом комплексов «копии ДНК-метка», для чего нужны источник тока и камера для электрофореза, источник ультрафиолетового излучения (транслюминатор) для создания светового потока в области ультрафиолетового спектра при анализе агарозных гелей. Для электрофореза используют агарозный или полиакриламидный гель с этидия бромидом, образующим комплексы с ДНК, флюоресцирующие в ультрафиолетовых лучах. Удаётся разделить фрагменты ДНК длиной до 500 нуклеотидов, отличающиеся только на 1 нуклеотид.

2. *Колориметрическое определение* продуктов работы белкового комплекса, связавшегося с копиями ДНК. Нужен много- или одноканальный фотометр для плашек, промыватель для них. На дне лунок плашки фиксирован белок BSA, способный связывать копии нитей ДНК. После инкубации неиспользованные компоненты удаляют промыванием. Для оценки результатов реакции добавляют связывающийся в лунке комплекс белка авидина с ферментом, непрореагировавшие компоненты отмывают и добавляют субстраты для фермента. Фермент преобразует субстраты в цветные продукты, интенсивность окраски регистрируют фотометрически.

Вопросы для самоконтроля

1. Общие принципы, этапы и механизмы матричных биосинтезов нуклеиновых кислот, ключевые ферменты процессов.
2. Этапы биосинтеза белка (транскрипция, рекогниция, трансляция).
3. Транскрипция, созревание различных видов РНК (сплайсинг и др.), ферменты, рибозимы. Этапы и механизм активации аминокислот, ферменты, т-РНК, соотношение компонентов.
4. Этапы трансляции, характеристика участников, факторы регуляции, механизм образования пептидной связи на рибосомах. Значение нематричного синтеза пептидной связи.
5. Регуляция биосинтеза белка. Лас-оперон, триптофановый оперон и другие.
6. ИФА и ПЦР-анализ, методология и клинико-диагностическое значение.

7. Генно-инженерные пути синтеза белковых препаратов.
8. Влияние лекарственных препаратов на различные этапы биосинтеза белка.

Тестовые задания

Выбрать правильные ответы.

1. ГЕНОМ ЯВЛЯЕТСЯ ОТРЕЗОК ДНК,
 - 1) состоящий из экзонов и интронов
 - 2) где хранится информация о первичной структуре полипептида
 - 3) где хранится информация о вторичной структуре полипептида

2. К ФУНКЦИЯМ ДНК ОТНОСЯТСЯ
 - 1) хранение генетической информации
 - 2) передача генетической информации по наследству дочерним клеткам
 - 3) участие в синтезе РНК
 - 4) участие в окислительных реакциях

3. ПЕРВИЧНЫМ ТРАНСКРИПТОМ ЯВЛЯЕТСЯ
 - 1) соединение РНК с белком в цитоплазме
 - 2) ДНК, синтезированная полуконсервативным методом
 - 3) РНК, синтезируемая в стадии транскрипции
 - 4) РНК, полученная в результате модификации концов молекулы

4. В МОЛЕКУЛЕ ДНК ОТСУТСТВУЕТ
 - 1) аденин
 - 2) тимин
 - 3) урацил
 - 4) гуанин
 - 5) рибоза
 - 6) цитозин
 - 7) дезоксирибоза

5. ДЛЯ АМИНОАЦИЛ-ТРНК ХАРАКТЕРНО
 - 1) связывание с ДНК
 - 2) связывание с рибосомой
 - 3) наличие связи аминокислоты с т-РНК
 - 4) перенос белка в рибосомы

6. ПРИ ПОСТТРАНСКРИПЦИОННОМ ПРОЦЕССИНГЕ ПРОИСХОДИТ
 - 1) модификация 5- и 3-концов всех видов РНК
 - 2) модификация 5- и 3-концов и-РНК
 - 3) модификация азотистых оснований РНК
 - 4) репарация и-РНК, т-РНК, р-РНК
 - 5) сплайсинг и сшивание остатков РНК

7. ИНИЦИАТОРАМИ РИБОСОМНОГО ЦИКЛА ЯВЛЯЮТСЯ

- 1) мРНК
- 2) АТФ
- 3) ГТФ
- 4) малая субъединица рибосомы
- 5) большая субъединица рибосомы
- 6) аминоксил-т-РНК
- 7) белковые факторы инициации

8. ПРОЦЕСС СИНТЕЗА ДНК НА МАТРИЦЕ РНК НАЗЫВАЕТСЯ

- 1) репликацией
- 2) транскрипцией
- 3) трансляцией
- 4) рекогницией

9. НАСЛЕДСТВЕННАЯ ИНФОРМАЦИЯ СОДЕРЖИТСЯ В МОЛЕКУЛЕ

- 1) р-РНК
- 2) и-РНК
- 3) ДНК
- 4) т-РНК

10. В РЕПАРАЦИИ ДНК УЧАСТВУЮТ

- 1) пептидилтрансфераза и пептидилтранслоказа
- 2) экзо- и эндонуклеазы
- 3) ДНК-зависимая РНК-полимераза
- 4) ДНК-полимераза
- 5) нуклеозидаза
- 6) ДНК-лигаза

Ситуационные задачи

1. Ребёнок в возрасте 1 года поступил в детскую больницу с явлениями отсталости физического и умственного развития. При исследовании мочи выявлена высокая концентрация мочевой кислоты.
Пояснить причину её появления.
2. При недостатке в рационе фолиевой кислоты развиваются мегалобластическая анемия, лейкопения, нарушается состояние слизистых оболочек и кожи.
Пояснить биохимическую причину таких нарушений.

ОБМЕН БЕЛКОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ. МАТРИЧНЫЕ БИОСИНТЕЗЫ (КОНТРОЛЬ ПО ТЕМАМ 9-10)

Вопросы для самоподготовки

Обмен аминокислот и белков. Аммиак

1. Баланс азота в организме. Понятие азотистого равновесия. Биологическая ценность белка. Заменяемые и незаменимые аминокислоты. Принципы составления рационов питания.
2. Переваривание белков в желудочно-кишечном тракте. Основные ферменты. Активация проферментов, специфичность и механизм действия, локализация в желудочно-кишечном тракте. Нарушения внешнего обмена белков.
3. Желудочный сок, его основные компоненты. Механизм синтеза соляной кислоты, её биологическая роль. Понятие кислотности желудочного сока.
4. Гниение белков в кишечнике, биологическая роль. Механизмы обезвреживания продуктов гниения. Строение и функции УДФГК и ФАФС.
5. Дезаминирование, его виды. Строение ферментов. Глутаматдегидрогеназа, механизм функционирования, регуляция активности, биологическая роль.
6. Механизмы трансаминирования. Строение ферментов, роль витамина В₆. Клинико-диагностическое значение теста определения активности аминотрансфераз в плазме крови.
7. Трансдезаминирование (непрямое дезаминирование), этапы, роль в метаболизме. Глюко- и кетогенные аминокислоты. Ацетил~КоА и другие ключевые молекулы путей использования продуктов дезаминирования аминокислот.
8. Пути превращения аминокислот в тканях до конечных продуктов: CO₂, H₂O, NH₃. Энергоэффект окисления аланина, глутамата, аспартата.
9. Декарбоксилирование аминокислот. Строение ферментов. Роль витамина В₆. Биологическая роль аминов – гистамина, γ-аминомасляной кислоты, серотонина. Ферментные системы инактивации биогенных аминов.
10. Пути образования и утилизации аммиака в тканях. Гипераммониемия.
11. Синтез амидов. Роль глутамина, других аминокислот в транспорте аммиака.
12. Механизм синтеза мочевины. Реакции орнитинового цикла, ферменты, компартментализация в клетке, энергетический эффект процесса.
13. Аммонийогенез. Локализация и роль процесса.
14. Синтез креатина, креатинфосфата, креатинина. Роль креатинфосфата.
15. Метаболизм глицина и серина, фенилаланина и тирозина, глутамата и аспартата, серосодержащих аминокислот.

Обмен нуклеотидов, матричные биосинтезы

1. Расщепление нуклеопротеинов в желудочно-кишечном тракте. Превращения пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов в тканях.
2. Представления о синтезе и распаде пуриновых нуклеотидов (АМФ, ГМФ), роль аминокислот, ключевая стадия, механизм регуляции скорости синтеза.
3. Синтез и распад УМФ, ЦМФ и ТМФ.

4. Синтез нуклеозидтрифосфатов. Образование дезоксирибонуклеотидов, роль НАДФН и тиоредоксина.
5. Нарушения обмена пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Молекулярные механизмы развития мочекаменной болезни, подагры, синдрома Леша-Нихана, оротацидурии.
6. Механизм синтеза ДНК. Ферменты репликации ДНК. Роль репликации в передаче генетической информации.
7. Механизм синтеза ДНК (обратная транскрипция, фермент ревертаза). Генная инженерия. Биотехнология.
8. Механизм синтеза РНК, созревание молекул РНК. Ферменты транскрипции и процессинга рибонуклеиновых кислот.
9. Биосинтез белка. Молекулярные механизмы отдельных этапов: активации аминокислот, рекогниции и трансляции (стадии инициации, элонгации, терминации).
10. Представления о механизмах регуляции синтеза белка. Транскриптон, оперон: строение и функции. Репрессия и индукция синтеза белка.
11. Представления о нематричном образовании пептидов, роли таких пептидов в организме.
12. Использование ингибиторов и активаторов синтеза белка и нуклеотидов в медицине. Аминокислоты и белки – лекарственные препараты.

Практическая часть

1. Ацидотест.
2. Обнаружение соляной кислоты в желудочном соке.
3. Определение свободной, общей и связанной соляной кислоты.
4. Обнаружение гемоглобина в желудочном соке.
5. Обнаружение лактата в желудочном соке.
6. Определение активности аминотрансфераз в сыворотке крови.
7. Хроматографическое разделение аминокислот.
8. Определение содержания мочевины в сыворотке крови и моче.
9. Определение содержания мочевой кислоты в сыворотке крови и моче.
10. Определение содержания белка в сыворотке крови.
11. Иммуноферментный анализ.
12. ПЦР-диагностика.

ТЕМА 11. РЕГУЛЯЦИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ. СТРОЕНИЕ И КЛАССИФИКАЦИЯ ГОРМОНОВ. НАРУШЕНИЯ ГОРМОНАЛЬНОЙ РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЗМА. БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕБРАНЫ

1. ИЕРАРХИЯ СИСТЕМ РЕГУЛЯЦИИ. ГОРМОНЫ

Актуальность

Одной из особенностей живых организмов является их способность сохранять постоянство гомеостаза при помощи механизмов саморегуляции, в осуществлении которых одно из главных мест принадлежит гормонам. Каждый гормон имеет конкретное место в иерархии регуляторных систем организма, контролируемых ЦНС. Гипоталамус переводит сигналы мозга на язык химических посредников и определяет деятельность гипофиза. Гипофиз регулирует функции периферических эндокринных желёз, способных по механизмам обратной связи влиять на центральные звенья эндокринной системы. Кортикотропин и гормоны надпочечников выполняют функции, связанные с состояниями острого и хронического напряжения, обеспечивая устойчивость к повреждающим воздействиям среды. В регуляции функций организма и обмена веществ (белков, углеводов, липидов, минералов, воды) и энергии участвуют гормоны поджелудочной, щитовидной, паращитовидных и других желёз. Гормоны половой сферы оказывают анаболические эффекты, участвуют в поддержании полового поведения и процессов размножения. Нарушения в стройной системе влияния гормона на клетку ведут к недостаточности или изменению его эффекта. Для правильной оценки причин возникновения гормональных заболеваний необходимо понимать механизмы передачи гормонального сигнала клетке. К нарушениям процессов обмена приводят изменения регуляции при недостаточном или избыточном синтезе гормонов.

В клинике широко используют гормоны и гормональные препараты для лечения эндокринных и неэндокринных заболеваний. Глюкокортикоиды известны как противовоспалительные и антиаллергические препараты. Половые гормоны и их аналоги применяют в онкологии, контрацепции и заместительной терапии.

Цель

1. Изучить строение, механизмы действия и биологические эффекты гормонов белково-пептидной, стероидной природы и производных аминокислот.
2. Научиться выявлять йод в тироксине, катехоламины, белковую природу инсулина.

Вопросы для самоподготовки

1. Иерархия регуляторных систем организма. Принципы регуляции обменных процессов. Роль ЦНС, гипоталамо-гипофизарная система. Механизм обратной отрицательной связи в регуляции синтеза и действия гормонов. Понятие о системах межклеточной коммуникации: эндо-, пара- и аутокринной.
2. Гормоны – первичные посредники. Общие биологические признаки гормо-

нов. Классификации гормонов в соответствии с химическим строением, биологическими функциями, принадлежностью к эндокринным железам.

3. Либерины и статины гипоталамуса, строение и роль. Гормоны – производные проопиомеланокортина, синтез и значение альтернативного процессинга, функции. Гормоны задней доли гипофиза, происхождение и роль. Значение тропных гормонов гипофиза.
4. Характеристика гормонов гипофиза (соматотропин, вазопрессин, окситоцин, липотропин, меланоцитостимулирующий гормон) по общему плану: *название, химическая природа/формула, место синтеза, регуляция синтеза и секреции, основные органы-мишени, локализация рецепторов в клетке, механизм действия, влияние на обмен веществ и функции организма; причины и основные клинические проявления гипо- и гиперфункции.*
5. Адреналин: характеристика по общему плану (см. п.4), химизм синтеза и инактивации, клинические проявления и основы лечения феохромоцитомы. Типы адренорецепторов и особенности их действия. Биохимические эффекты адреналина при стрессовых ситуациях. Механизм лечебного действия адреналина при остановке сердца, приступах астмы.
6. Этапы синтеза стероидных гормонов из холестерина. Прегненолон, прогестерон – ключевые соединения пути синтеза. Специфические гидроксилазы синтеза глюко-, минералокортикоидов. Роль ароматаз в синтезе эстрогенов.
7. Роль гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы. Характеристика кортиколиберина, кортикотропина (АКТГ) и кортизола по общему плану (см. п.4). Изменение метаболизма в жировой, мышечной, лимфоидной, эпителиальных тканях при гипо- и гиперкортицизме. Стероидный диабет.
8. Ренин-ангиотензин-альдостероновая система. Волюморецепторы и система ренин-ангиотензин в регуляции синтеза и секреции альдостерона, значение ферментов. Биохимический механизм развития почечной гипертензии. Характеристика альдостерона по общему плану (см. п.4), влияние на обмен минеральных веществ и воды.
9. Система половых гормонов. Характеристика окситоцина, лактотропного, фолликулостимулирующего и лютеинизирующего гормонов гипофиза, прогестерона и эстрадиола, тестостерона по общему плану (см. п.4). Цикличность изменений концентрации гонадотропных гормонов, прогестерона и эстрогенов в организме женщины (менструальные циклы). Анаболические эффекты тестостерона и эстрогенов.

Темы для реферативных сообщений

1. Механизмы и уровни регуляции функций эндокринных желез, нарушения механизмов и последствия.
2. Гормонозависимая индукция и репрессия синтеза белка. Особенности рецептора и гормонорецепторного комплекса, их действие. Гормоночувствительный элемент ДНК.
3. Глюкокортикоиды – лекарственные препараты. Механизм противовоспалительного и антиаллергического действия, побочные эффекты.
4. Роль глюкокортикоидов при стресс-реакции организма и в развитии адапта-

ционного синдрома. Работы Г.Селье, Ф.Меерсона и др.

5. Гормональные изменения в организме женщины при беременности. Влияние гормональных заболеваний матери на развитие плода.
6. Синтетические аналоги эстрогенов и прогестинов в гормональной контрацепции, её механизмы и побочные эффекты.
7. Синтетические аналоги тестостерона – лекарственные препараты. Анаболические стероиды и другие гормоны в медицине и спорте, побочные эффекты.

Самостоятельная работа

Заполнить таблицу гормонов (приложение 5): названия, химическая природа, место синтеза, органы-мишени, локализация рецепторов и механизм действия, влияние на обмен веществ, гипо- и гиперфункция. Дополнить таблицы аминокислот и витаминов (составленные по материалу темы 1 и темы 4), представив сведения по гормонам и медиаторам (производным аминокислот) и участию витаминов в обмене гормонально активных веществ. Дополнить схему обмена липидов (составленную по теме 8), представив химизм синтеза стероидных гормонов и кальцитриолов из холестерина, вторичных посредников из фосфатидилинозитола, высвобождение арахидоновой кислоты из фосфатидилхолина для синтеза эйкозаноидов.

Лабораторная работа 1

Качественная реакция на йод в тироксине

Принцип

Метод основан на способности йода, высвобождаемого при гидролизе тиреоидина, давать в реакции с крахмалом характерную синюю окраску.

Реактивы

1) 10% раствор NaOH, 2) 10% раствор H_2SO_4 , 3) 2% раствор KJ, 4) 10% раствор $NaHCO_3$, 5) 1% раствор крахмала, 6) 0,5% спиртовой раствор фенолфталеина, 7) лакмусовая бумага.

Материал для исследования

Таблетки тиреоидина (перед лабораторным занятием лаборанты выполняют гидролиз тиреоидина: растирают в ступке 10 таблеток, вносят в колбу для гидролиза, добавляют 20 мл 10% $NaHCO_3$, колбу с обратным холодильником помещают на асбестовую сетку, кипятят точно 15 мин с момента закипания).

Проведение анализа

Для обнаружения йода в гидролизате тиреоидина наливают 24 капли гидролизата, 3 капли 1% раствора крахмала, 1 каплю 0,5% спиртового раствора фенолфталеина, 4 капли 2% раствора KJ, добавляют 10–15 капель 10% раствора H_2SO_4 до прекращения выделения пузырьков углекислого газа и появления синего окрашивания.

Оформление работы

Указывают принцип метода, регистрируют результаты анализа, делают вывод о наличии тироксина в исследуемой пробе, указывают роль гормона.

Лабораторная работа 2

Качественные реакции на адреналин

Реактивы

1) 10% раствор NaOH, 2) 0,15 моль/л раствор FeCl₃.

Материал для исследования

Раствор адреналина, приготовленный *ex tempore*.

РЕАКЦИЯ НА ПИРОКАТЕХИНОВОЕ КОЛЬЦО АДРЕНАЛИНА

Принцип

Раствор FeCl₃, реагируя с пирокатехиновым кольцом молекулы адреналина, образует продукты зелёного цвета, которые в щелочной среде меняют окраску на вишнёво-красную.

Проведение анализа

К 10 каплям раствора адреналина добавляют 1 каплю раствора FeCl₃. Наблюдают зелёное окрашивание. После добавления 1 капли 10% раствора NaOH окраска становится вишнёво-красной.

ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ ПРОДУКТОВ ОКИСЛЕНИЯ АДРЕНАЛИНА

Принцип

Адреналин, окисляясь кислородом воздуха, образует флуоресцирующие в щелочной среде продукты.

Проведение анализа

К 10 каплям дистиллированной воды приливают 6 капель 10% раствора NaOH и 2–4 капли раствора адреналина. В свете ртутно-кварцевой лампы наблюдают зелёную флуоресценцию продуктов окисления адреналина.

Оформление работы

Указывают принципы методов, регистрируют результаты, делают заключение о наличии адреналина в пробе, указывают его значение в организме.

Лабораторная работа 3

Качественные реакции на белковый характер инсулина

Принцип

Гормон инсулин является простым белком, поэтому даёт характерные качественные реакции на отдельные аминокислоты и на пептидные связи в белках: биуретовую, нингидриновую, ксантопротеиновую, Фоля и другие неспецифические реакции.

Материал для исследования

Раствор инсулина.

Реактивы

1) 10% раствор NaOH, 2) 5% раствор CuSO₄, 3) 0,5% раствор нингидрина, 4) концентрированная HNO₃, 5) 30% раствор NaOH, 6) 5% раствор Pb(CH₃COO)₂, 7) 5% раствор нитропруссиды натрия.

Проведение анализа

В 5 пробирок наливают по 5 капель раствора инсулина, проводят соответствующие качественные реакции.

РЕАКЦИЯ НА ПЕПТИДНУЮ СВЯЗЬ

Пептидные связи выявляют универсальной биуретовой реакцией.

Проведение анализа

В пробирку с 5 каплями раствора инсулина вносят 3 капли 10% раствора NaOH, 1 каплю 5% раствора CuSO₄ и наблюдают фиолетовую окраску.

РЕАКЦИЯ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ α -АМИНОГРУПП

Для обнаружения в инсулине α -аминогрупп аминокислотных остатков и концевых α -аминогрупп используют нингидриновую реакцию.

Проведение анализа

К 5 каплям раствора инсулина добавляют 5 капель 0,5% раствора нингидрина. Пробирку кипятят до появления сине-фиолетового окрашивания.

РЕАКЦИЯ НА АРОМАТИЧЕСКИЕ АМИНОКИСЛОТЫ

Для обнаружения в инсулине ароматических аминокислот (фенилаланин, тирозин, триптофан) используют ксантопротеиновую реакцию.

Проведение анализа

К 5 каплям 1% раствора инсулина вносят 2 капли конц. HNO₃, осторожно нагревают и наблюдают за появлением жёлтого окрашивания. При отсутствии жёлтого цвета добавляют ещё 1–2 капли конц. HNO₃. Далее добавляют избыток 30% раствора NaOH, наблюдают изменение окраски с жёлтой на оранжевую.

РЕАКЦИИ НА СЕРОСОДЕРЖАЩИЕ АМИНОКИСЛОТЫ

Принцип

Сульфгидрильные группы инсулина подвергаются щелочному гидролизу с отщеплением серы в виде Na₂S, который в реакции: а) с ацетатом свинца даёт черный или бурый осадок сульфида свинца; б) с нитропруссидом натрия даёт соединение красно-коричневого цвета.

Проведение анализа

В две пробирки с 5 каплями раствора инсулина добавляют по 5 капель 30% раствора NaOH и кипятят 1–2 минуты. Проводят реакции а) и б).

а) **Реакция Фоя:** к гидролизату добавляют 1 каплю раствора ацетата свинца и нагревают до кипения. Появляется бурый или чёрный осадок.

б) **Реакция с нитропруссидом:** к гидролизату добавляют 3 капли раствора нитропрусида натрия. Появляется красно-коричневая окраска.

Оформление работы

Приводят принципы методов, регистрируют полученные результаты, делают вывод о наличии инсулина в исследуемом материале, указывают значение этого гормона в организме.

Вопросы для самоконтроля

1. Межклеточная коммуникация. Иерархия регуляторных систем организма, место гормонов, взаимосвязи. Понятие о системах эндо-, пара-, аутокринной регуляции.
2. Гормоны как первичные посредники. Разнообразие, классификации (по строению, по биологическим функциям) и характерные признаки гормонов.
3. Синтез белка и протеолиз в механизмах образования белково-пептидных гормонов. Построение, принципы получения гормонов белково-пептидной природы из предшественника проопиомеланокортина (ПОМК).
4. Реакции биосинтеза гормонов – производных аминокислот (катехоламины, тиреоиды), холестерина (половые и кортикоидные стероиды, кальцитриолы).
5. Понятие о тканевых гормонах. Источники, причины и механизмы образования, функции. Биологически активные липиды.
6. Влияние систем гормонов и отдельных гормонов на различные виды обмена веществ и функции организма. Клетки-мишени и виды клеточной рецепции гормонов, рецепция каждого и механизм действия на клетку, гипо- и гиперфункция.
7. Причины возникновения гормональных заболеваний.
8. Направления использования гормонов в клинике. Проблемы использования гормонов в сельском хозяйстве и гормонального допинга в спорте.

2. СТРОЕНИЕ И РОЛЬ БИОМЕМБРАН.

МЕХАНИЗМЫ ТРАНСПОРТА И РЕЦЕПЦИИ (СЕМИНАР)

Актуальность

Функциональной единицей живого является клетка. Клеточной мембране принадлежит одно из ведущих мест в поддержании жизнедеятельности клетки, формировании адекватного клеточного ответа и адаптации к требованиям молекулярного окружения и организма в целом. Каждый внешний сигнал имеет конкретную направленность и поддерживается комплексом рецепторно-эффекторных механизмов, обеспечивающих совокупную результативность клеток органов и тканей. Наличие множества регуляторных молекул различной природы определяет разнообразие механизмов передачи гормональных и иных сигналов в клетку.

Биомембрана – сложная надмолекулярная высокоорганизованная полифункциональная двумерная система, состоящая в основном из липидов и белков и некоторого количества углеводного компонента. Бислойность и пластичность структуры обеспечивают глицерофосфолипиды, сфингофосфолипиды и холестерол. Функциональность мембран зависит от поверхностных и трансмембранных белков и ферментов. Белково-углеводные компоненты плазмолеммы лежат в основе контактного и рецепторного аппарата клетки, нарушения которого ведут к изменению или недостаточности эффекта гормона (сахарный диабет II типа). Клеточная мембрана участвует в механизмах эндо- и экзоцитоза, трансмембранном переносе веществ – пути пассивного и активного транспорта.

Моделирование биомембран путём создания липосом, нагруженных лекарственными препаратами, находит применение в фармации и медицине.

Цель

Изучение химического строения и основных функций биомембран, механизмов транспорта веществ и рецепции регуляторных молекул различной природы.

Вопросы для самоподготовки

1. Разнообразие компонентов биомембран, межмолекулярные связи и взаимодействия в составе мембран.
2. Строение, свойства и функции мембранных липидов. Значение полиненасыщенных жирных кислот и холестерина. Аннулярные липиды. Липидные якоря: происхождение и назначение.
3. Белки мембран, классификации по локализации и функциям.
4. Состав, локализация и назначение углеводного компонента мембран.
5. Липопротейны, гликопротеины и гликолипиды мембран.
6. Свойства и основные функции биомембран клетки. Асимметрия липидов клеточной мембраны, функциональное значение. Флиппазы.
7. Особенности плазматической мембраны клетки и мембран органелл: ядерной, митохондриальной, лизосомальной, микросомальной и шероховатой эндоплазматической сети. Маркёрные ферменты биомембран.
8. Биохимическое обеспечение механизмов трансмембранного переноса веществ: простой и облегченной диффузии, активного транспорта, эндо- и экзоцитоза. Каналы и поры.
9. Липосомы – модельные биомембраны, применение в фармации и медицине.
10. Характеристика основных типов рецепторов плазмалеммы, обеспечивающих передачу гормонального сигнала в клетки-мишени.
11. Характеристика мембранных механизмов передачи гормонального сигнала в клетки-мишени через рецепторы:
 - I типа, обладающие ферментной активностью (рецептор инсулина),
 - II типа, образующие ионный канал (рецептор ацетилхолина),
 - III типа, использующие G-белок (компоненты передающей системы, роль активирующей/ингибирующей α -субъединицы G-белка):
 1. аденилатциклазный механизм (и гормоны, использующие его),
 2. Са-фосфолипидный механизм (и гормоны, использующие его).
12. Гуанилатциклазный механизм передачи сигнала: мембраносвязанный и растворимый рецепторы. Общая характеристика и виды гуанилатциклаз. Гормоны, использующие этот механизм.
13. Связь гуанилатциклазного механизма с синтезом NO, типы NO-синтаз, реакционноспособность и биологическое значение NO, способы утилизации.
14. Строение, источники, реакции синтеза вторичных посредников передачи гормонального сигнала: цАМФ, цГМФ, ИФЗ, ДАГ, ионы Ca^{2+} , NO.
15. Характеристика цитозольно-ядерного механизма передачи гормональных сигналов в клетки-мишени. Гормоны, использующие этот механизм.
16. Биологический смысл существования иерархии регуляторных систем, ис-

пользующих различные механизмы передачи одного гормонального сигнала к компартментам клетки-мишени.

Темы для реферативных сообщений

1. Гликолипиды мембран: структура, функции, нарушения обмена.
2. Роль монооксида азота (NO) в регуляции деятельности клеток в норме и патологии, участие в действии лекарств.
3. Строение и характеристика липосом. Использование липосом для транспорта лекарственных средств.

Вопросы для самоконтроля

1. Разнообразие биомембран клетки. Основные функции биомембран.
2. Структура, свойства и роль основных липидов биомембран. Строение, локализация и значение белковых и углеводных компонентов в мембранах.
3. Надмолекулярные мембранные комплексы, построение, назначение.
4. Виды транспорта веществ через биомембраны, особенности каждого из них.
5. Основные типы рецепторов, обеспечивающих передачу гормонального сигнала в клетки-мишени, разнообразие механизмов передачи сигнала.
6. Разнообразие вторичных посредников, их взаимодействие при передаче сигнала, реакции синтеза и инактивации.
7. Липосомы, использование в медицине.

Тестовые задания

Выбрать один правильный ответ.

1. СОДЕРЖАНИЕ КАЛЬЦИЯ И ФОСФАТОВ В КРОВИ РЕГУЛИРУЮТ
 - 1) адреналин и глюкагон
 - 2) адреналин и тироксин
 - 3) паратгормон и кальцитонин
 - 4) кальцитонин и соматотропин
 - 5) кальцитриол и кортизол
2. СИНТЕЗ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ В КОРЕ НАДПОЧЕЧНИКОВ СТИМУЛИРУЕТ
 - 1) кортикотропин
 - 2) кортиколиберин
 - 3) кортизол
 - 4) кальцитонин
 - 5) кальцитриол
3. ФУНКЦИЕЙ ИНСУЛИНА ЯВЛЯЕТСЯ
 - 1) стимуляция липолиза
 - 2) активация гликогенолиза
 - 3) увеличение гликемии
 - 4) усиление липогенез
 - 5) активация глюконеогенеза

4. ПРИ ПОВЫШЕНИИ УРОВНЯ СОМАТОТРОПИНА РАЗВИВАЕТСЯ
- 1) акромегалия
 - 2) синдром Иценко-Кушинга
 - 3) Базедова болезнь
 - 4) сахарный диабет
 - 5) остеомалация
5. ДЛЯ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА СПЕЦИФИЧЕН БЕЛОК
- 1) гемоглобин
 - 2) H^+ /АТФ-синтаза
 - 3) гликофорин
 - 4) Na^+ / Ca^{2+} -обменник
 - 5) Na^+ / K^+ -АТФаза
6. В СОСТАВЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН ПРИСУТСТВУЮТ
- 1) эфиры холестерина и сфинголипиды
 - 2) свободный холестерол и гликолипиды
 - 3) фосфолипиды и триацилглицеролы
 - 4) гликолипиды и триолеинглицеролы
 - 5) фосфолипиды и эфиры холестерина
7. ПРИ ПОДДЕРЖАНИИ ТЕКУЧЕСТИ МЕМБРАН МИНИМАЛЬНЫМ ТИПОМ ДВИЖЕНИЙ МОЛЕКУЛ В БИСЛОЕ ЛИПИДОВ ЯВЛЯЕТСЯ
- 1) латеральная диффузия
 - 2) движение по типу «пинг-понг»
 - 3) трансмембранный перескок «флип-флоп»
 - 4) вращение
 - 5) изгибание
 - 6) хемотаксис
8. РЕЦЕПТОР СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ В ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЕ СПОСОБЕН
- 1) обеспечивать проницаемость мембраны клетки
 - 2) специфически узнавать и реагировать с липидным окружением
 - 3) генерировать внутриклеточный управляющий сигнал
 - 4) взаимодействовать с АТФ
 - 5) поддерживать структуру мембраны
9. ВТОРИЧНЫМИ МЕССЕНДЖЕРАМИ ФОСФОЛИПИДНОГО МЕХАНИЗМА ПЕРЕДАЧИ РЕГУЛЯТОРНОГО СИГНАЛА В КЛЕТКУ ЯВЛЯЮТСЯ
- 1) цАМФ, цГМФ, Ca^{2+}
 - 2) ДАГ, ИФ₃, NO
 - 3) ДАГ, ИФ₃, Ca^{2+}
 - 4) цГМФ, Ca^{2+} , NO
 - 5) цАМФ, Ca^{2+} , NO

10. ВОЗДЕЙСТВИЕ АНГИОТЕНЗИНА НА МЕМБРАННЫЙ РЕЦЕПТОР ПРИВОДИТ К

- 1) открытию ионных каналов
- 2) синтезу вторичных посредников в мембране
- 3) росту каталитической активности рецептора
- 4) синтезу вторичных посредников в цитозоле
- 5) активации фосфодиэстеразы

Ситуационные задачи

1. При обследовании мальчика 5 лет врач отметил отставание умственного и психического развития, замедление роста, понижение температуры тела. Ребенок мало активен, не эмоционален. В крови снижено содержание холестерина.

Указать, о дисфункции какой эндокринной железы можно думать. Пояснить, в чём причина таких симптомов.

2. Больная обратилась в клинику с жалобами на сухость во рту, сильную жажду, обильное и частое мочеиспускание, слабость, нарушение сна, похудание.

Указать, для какого заболевания характерны эти симптомы. Пояснить, какие гормоны могут быть ответственны за нарушения, какие лабораторные исследования нужны для уточнения диагноза и оценки состояния обмена веществ.

РЕГУЛЯЦИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ. ГОРМОНЫ И МЕДИАТОРЫ. НАРУШЕНИЯ ГОРМОНАЛЬНОЙ РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЗМА. БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ (КОНТРОЛЬ ПО ТЕМЕ 11)

Вопросы для самоподготовки

Мембраны и рецепция

1. Разнообразие компонентов биомембран, строение клеточных мембран, межмолекулярные связи и взаимодействия в составе мембран. Липопротеины, гликопротеины и гликолипиды. Состав, локализация и назначение углеводного компонента мембран, участие в рецепции и контактах клетки.
2. Строение, свойства и функции мембранных липидов. Значение полиненасыщенных жирных кислот и холестерина, мембраны как источник регуляторных веществ. Аннулярные липиды. Липидные якоря: происхождение, синтез и назначение.
3. Белки мембран, классификации по локализации и функциям. Поверхностные и трансмембранные белки и ферменты, каталитический домен. Участие в сигналинге.

4. Свойства и основные функции биомембран клетки. Разнообразие и специфика мембран. Асимметрия липидов клеточной мембраны и её функциональное значение, флиппазы. Маркёрные ферменты.
5. Особенности мембран клетки: плазматическая и ядерная мембраны, мембраны митохондрий, эндоплазматической сети, лизосом, пероксисом. Каналы и поры плазмолеммы и мембран клеточных органелл.
6. Биохимическое обеспечение активных и пассивных механизмов трансмембранного переноса малых веществ и макромолекул (простой и облегченной диффузии, активного транспорта, эндо- и экзоцитоза).
7. Липосомы как модельная система биомембран, их строение, применение в фармации и медицине.
8. Мембранные механизмы передачи гормонального сигнала в клетку-мишень. Виды рецепторов плазмолеммы: с ферментативной активностью, с ионопроводящей активностью и связанные с G-белками. Регуляция работы рецепторного аппарата (фосфорилирование, понижающая регуляция).
9. Взаимодействие вторичных посредников при передаче сигнала в клетку.
10. Системы вторичных посредников и рецепторы, связанные с G-белками, взаимодействие этих систем. Аденилатциклазный и кальций-фосфолипидный механизмы действия гормонов: трансдукция сигнала рецептором, протеинкиназы и фосфорилирование белков, ответственных за проявление эффекта. Строение вторичных посредников, источники и реакции синтеза.
11. Ионы кальция как вторичные посредники, регуляция уровня кальция в цитозоле клетки, кальмодулин, кальциевые каналы, биологическая роль кальция.
12. Общая характеристика гуанилатциклазного механизма действия гормонов, мембрано-ассоциированный и растворимый рецепторы, взаимосвязь с синтезом NO. Строение вторичных посредников, источники и реакции синтеза.
13. Цитозольно-ядерный механизм действия гормонов. Отличие от мембранного механизма передачи гормонального сигнала в клетку. Цитозольные и ядерные рецепторы, понятие «гормон-чувствительный элемент». Механизм действия стероидных гормонов, активных форм витамина D₃.
14. Роль синапса в разнообразии рецепторного аппарата клетки. Строение и функционирование синапса, роль Ca²⁺, постсинаптической мембраны, ферментов.

Гормональная регуляция

1. Иерархия регуляторных систем организма (роль ЦНС, гипоталамуса, гипофиза). Место гормонов в регуляции метаболизма и функций органов. Механизм обратной отрицательной связи. Общие биологические признаки гормонов, классификации (по химическому строению, биологическим функциям, принадлежности к эндокринным железам).
2. Классификация гормонов по химическому строению, по биологическим функциям, по принадлежности к эндокринным железам. Роль либеринов, статинов, тропных гормонов. Обратная отрицательная связь в регуляции синтеза и действия гормонов.
3. Виды медиаторов нервной ткани, их роль. Аминокислоты – медиаторы воз-

буждения и торможения. Аминокислоты (тирозин, глутамат, триптофан и др.) в реакциях образования и инактивации медиаторов. Значение ГАМК-шунта ЦТК.

4. Механизмы действия медиаторов нервной ткани (норадреналин, ГАМК, ацетилхолин, дофамин), рецепторы постсинаптических мембран, роль Ca^{2+} , ферментов, биологические эффекты. Модуляторы.
5. Нейропептиды, синтез и рецепция, роль в нервной ткани и организме, участие в болевых реакциях. Малые регуляторные пептиды мозга.
6. Соматотропный гормон: химическая природа, место синтеза, органы-мишени, локализация и механизм действия рецепторов, влияние на обмен веществ. Регуляция синтеза и секреции гормона, состояния, связанные с нарушением действия гормона.
7. Характеристика антидиуретического гормона (вазопрессин): химическая природа, место синтеза, органы-мишени, рецепция, влияние на обмен веществ и воды. Регуляция синтеза и секреции гормона. Состояния, обусловленные нарушением действия гормона.
8. Характеристика окситоцина: химическая природа, место синтеза, регуляция синтеза и секреции, органы-мишени, локализация рецепторов и механизм действия, эффекты.
9. Характеристика паратгормона и кальцитонина: химическая природа, место синтеза, регуляция синтеза и секреции, органы-мишени, локализация рецепторов и механизм действия, влияние на обмен кальция, фосфатов, витамина D3. Взаимодействие этих гормонов с гормонально активными формами витамина D3 в обмене кальция и фосфатов.
10. Гормоны поджелудочной железы глюкагон и инсулин: химическая природа, место синтеза, регуляция синтеза и секреции, органы-мишени, локализация и механизм действия рецепторов, влияние на обмен углеводов, белков, липидов (ферменты, регулируемые гормоном). Состояния при отсутствии или избытке действия гормона.
11. Современные представления о механизмах развития инсулинзависимого сахарного диабета. Важнейшие изменения гормонального статуса и обмена веществ при сахарном диабете, механизмы развития осложнений сахарного диабета и диабетической комы.
12. Характеристика тиреотропного гормона: химическая природа, место синтеза, регуляция синтеза и секреции, органы-мишени, локализация рецепторов и механизм действия, эффекты.
13. Гормоны щитовидной железы тироксин и трийодтиронин: химическая природа, место синтеза, регуляция синтеза и секреции, органы-мишени, локализация рецепторов и механизм действия, влияние на обмен углеводов, белков, липидов. Состояния при отсутствии или избытке действия гормона.
14. Адреналин: химическая природа, место и химизм синтеза, органы-мишени, локализация рецепторов и механизм действия, влияние на обмен углеводов, белков, липидов (ферменты, регулируемые гормоном). Регуляция синтеза и секреции гормона. Состояния, обусловленные нарушением действия гормона. Участие адреналина в адаптивных реакциях организма при стрессе.

15. Характеристика адренкортикотропного гормона: химическая природа, место и принципы синтеза, регуляция синтеза и секреции, органы-мишени, локализация рецепторов и механизм действия, влияние на обмен веществ. Состояния, обусловленные отсутствием или избытком действия гормона.
16. Глюкокортикоиды: химическая природа, место и этапы синтеза, регуляция синтеза и секреции, органы-мишени, локализация рецепторов и механизм действия, влияние на обмен углеводов, белков, липидов. Состояния при отсутствии или избытке действия гормона. Участие глюкокортикоидов в адаптивных реакциях организма при стрессе, причины использования как противовоспалительных, противоаллергических лекарственных средств.
17. Минералокортикоиды: их химическая природа, место и этапы синтеза, регуляция синтеза и секреции, органы-мишени, локализация рецепторов и механизм действия, влияние на обмен электролитов и воды. Взаимосвязь с вазопрессином, ренин-ангиотензин-альдостероновая система.
18. Лактотропный гормон: химическая природа, место и этапы синтеза, регуляция синтеза и секреции, органы-мишени, локализация рецепторов и механизм действия, влияние на обмен веществ.
19. Характеристика гонадотропных гормонов: фолликулостимулирующий и лютеинизирующий гормоны: химическая природа, место и этапы синтеза, органы-мишени, локализация рецепторов и механизм действия, влияние на женский месячный цикл. Регуляция синтеза и секреции гормонов.
20. Андрогены и эстрогены: химическая природа, место и этапы синтеза, регуляция синтеза и секреции, органы-мишени, локализация рецепторов и механизм действия, влияние на обмен углеводов, белков, липидов, воздействие на костную ткань. Использование аналогов андрогенов и эстрогенов в качестве лекарственных средств.

Практическая часть

1. Качественные реакции на компоненты тироксина, адреналина, инсулина.

ТЕМА 12. ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ, СВОЙСТВА И ФУНКЦИИ КРОВИ. ОБМЕН ЖЕЛЕЗА. ФУНКЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ. НЕОРГАНИЧЕСКИЕ ВЕЩЕСТВА КРОВИ. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И СОСТАВ МОЧИ В НОРМЕ. ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ КОМПОНЕНТЫ МОЧИ.

1. БЕЛКИ, ФЕРМЕНТЫ, АЗОТОСОДЕРЖАЩИЕ ВЕЩЕСТВА КРОВИ

Актуальность

Существует тесная взаимосвязь крови со всеми тканями организма. Важнейшую роль играют фракции альбуминов и глобулинов, белки свёртывающей системы плазмы крови. Исследование различных по происхождению азотсодержащих компонентов плазмы крови (белковой и небелковой природы) и их роли в обмене веществ позволяет диагностировать нарушения метаболизма в организме, следить за развитием патологического процесса и оценивать эффективность терапевтических мероприятий. Соотношение азотсодержащих соединений в крови меняется в зависимости от образа жизни и возраста.

Цель

1. Изучить происхождение и клинико-диагностическое значение белков, ферментов и других азотсодержащих веществ плазмы крови.
2. Приобрести навыки определения: общего белка и его фракций, фракций остаточного азота в сыворотке крови.

Вопросы для самоподготовки

1. Органические и неорганические компоненты крови. Форменные элементы, плазма, сыворотка крови. Источники глюкозы, триацилглицеролов, холестерина и его фракций в крови. Клинико-диагностическое значение определения их содержания в крови.
2. Азотсодержащие вещества крови. Понятие общего белка крови. Определение концентрации общего белка в сыворотке крови, нормальные показатели и клинико-диагностическое значение. Причины гипо- и гиперпротеинемий.
3. Свойства белков крови, физиологические функции. Пробы на коллоидоустойчивость белков крови. Принцип тимоловой пробы и пробы Вельтмана. Нормальные показатели и клинико-диагностическое значение.
4. Основные белковые фракции сыворотки крови, нормальные величины. Примеры белков каждой фракции.
5. Диспротеинемии, парапротеинемии. Возрастная динамика белковых фракций. Эмбриоспецифические белки, их диагностическое значение.
6. Понятие протеинограммы, клинико-диагностическое значение определения белковых фракций. Принцип электрофореза. Изменение соотношения белковых фракций при остром и хроническом воспалении, патологиях печени, почек, опухолевых заболеваниях.
7. Основные ферменты плазмы и сыворотки крови. Понятие энзимодиагностики, примеры. Истинно плазменные (плазмоспецифичные) ферменты. Группы

пы органоспецифичных ферментов: индикаторные (клеточного метаболизма), экскреторные (секретируемые) ферменты. Примеры, возможности использования в диагностике заболеваний.

8. Остаточный азот крови, компоненты и их количественный состав. Причины и виды гиперазотемии. Определение общего количества остаточного азота в сыворотке крови. Нормальные показатели и клинико-диагностическое значение. Значение определения отдельных фракций остаточного азота.
9. Гипераммониемии, их причины и последствия. Нормальный и предельно допустимый уровни концентрации аммиака в крови. Причины токсичности аммиака, влияние на нервную ткань и энергетический обмен.
10. Синтез креатина и креатинина, нормальные величины концентрации в крови. Клинико-диагностическое значение оценки креатина и креатинина в крови и моче. Клиренс.
11. Синтез мочевины. Нормальные величины её концентрации в крови. Клинико-диагностическое значение определения концентрации мочевины в крови и моче.
12. Синтез мочевой кислоты. Нормальные величины концентрации в крови. Клинико-диагностическое значение определения концентрации мочевой кислоты в крови и моче.

Самостоятельная работа

Заполнить таблицу представителей основных глобулиновых фракций плазмы крови с указанием их функций, используя за основу приложение 5.

α_1 -Глобулины		α_2 -Глобулины		β -Глобулины		γ -Глобулины	
Белок	Функция	Белок	Функция	Белок	Функция	Белок	Функция

Темы для реферативных сообщений

1. Белки – положительные реактанты острой фазы воспаления.
2. Возрастная динамика белковых фракций. Эмбриоспецифические белки и их диагностическое значение.
3. Остаточный азот: его основные компоненты. Возрастная динамика уровня фракций остаточного азота.

Лабораторная работа 1

Определение содержания остаточного азота в сыворотке крови

Актуальность

Остаточный азот является суммарным показателем безбелкового азота крови. Он складывается из мочевины (около 50 %), аминокислот (около 25 %), эрготионеина (около 8 %), креатина и креатинина (до 7,5 %), пептидов, нуклеотидов и азотистых оснований (около 5 %), мочевой кислоты (до 4 %), аммиака и индикана (0,5 %). Поскольку показатель включает различные низкомолекулярные азотсодержащие вещества, то более информативным в клинике является определение отдельных фракций остаточного азота, а не суммарного показателя.

Принцип метода

Определение содержания остаточного азота по методу Аселя основано на сжигании безбелкового фильтрата с концентрированной серной кислотой и переходе азота органических веществ в сульфат аммония, который с реактивом Несслера образует продукты жёлто-оранжевого цвета. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации остаточного азота.

Реактивы

1) 10% раствор ТХУ, 2) конц. H_2SO_4 , 3) 3% раствор H_2O_2 , 4) реактив Несслера (щелочной раствор йодистых солей ртути и калия), 5) 5% раствор $NaOH$, 6) 26 ммоль/л стандартный раствор $(NH_4)_2SO_4$, 7) лакмусовая бумага.

Материал для исследования

Сыворотка крови.

Проведение анализа

Подготовительный этап (**выполняет лаборант**): в центрифужную пробирку вносят 1,8 мл дистиллированной воды, 0,2 мл сыворотки крови, 1,0 мл 10% раствора ТХУ, центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин, из пробирки берут 1,0 мл надосадка и переносят в термостойкую пробирку для минерализации, приливают 3 капли концентрированной H_2SO_4 и 3 капли H_2O_2 . Нагревают пробирку, осторожно упаривая жидкость до получения бесцветного минерализата.

На занятии цветную реакцию на остаточный азот студенты проводят согласно таблице:

	Опыт,	Стандарт,
Минерализат	1,0	—
Стандартный раствор $(NH_4)_2SO_4$	—	1,0
Раствор $NaOH$	Добавляют по каплям, проверяя величину рН по лакмусовой бумаге, пока рН не станет нейтральной и лакмус не посинеет (излишек $NaOH$ вызывает помутнение раствора)	
Дистиллиров. вода	8,0	8,0
Реактив Несслера	2,0	2,0
	Измеряют оптическую плотность опыта и стандарта против воды в кювете с длиной оптического пути 10 мм при длине волны 540 нм (зелёный светофильтр)	

Расчёт

$$\text{Содержание остаточного азота [ммоль/л]} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \cdot C_{\text{ст}}$$

где: $E_{\text{оп}}$ и $E_{\text{ст}}$ – оптическая плотность опытной и стандартной проб,
 $C_{\text{ст}}$ – концентрация стандартного раствора.

Клинико-диагностическое значение

Остаточный азот – это суммарный показатель состояния обмена белков. Снижение концентрации остаточного азота (гипоазотемия) возникает при снижении содержания мочевины, аминокислот или других его фракций.

Увеличение фракций остаточного азота, или гиперазотемия может быть *абсолютной*, связанной с действительным накоплением этих компонентов в крови, и *относительной*, связанной с дегидратацией организма. В свою очередь абсолютная гиперазотемия может быть ретенционная (почечного и внепочечного происхождения) и продукционная.

Ретенционная азотемия возникает в результате задержки выведения азотосодержащих веществ и бывает почечного происхождения (заболевания клубочков – нефриты, туберкулез почек, нефросклероз и др.) и внепочечного происхождения. Внепочечные гиперазотемии подразделяют на надпочечные (результат нарушения гемодинамики и падения фильтрационного давления при сердечно-сосудистой недостаточности, снижении артериального давления) и подпочечные (при гипертрофии или аденоме простаты, почечно-каменной болезни).

Продукционная азотемия выявляется при всех состояниях, связанных с увеличением распада белков, от ретенционной её отличает повышение содержания аминокислот в крови, а также одновременное накопление азотистых компонентов в крови и моче.

Оформление работы

Указывают принцип метода, фиксируют результаты, производят расчёты, делают вывод о возможной патологии, отмечают клинико-диагностическое значение.

Лабораторная работа 2 (теоретически)

Электрофорез белков на бумаге и ацетатцеллюлозных пленках

Принцип

Белковые молекулы, отрицательно заряженные при $pH=6,8$, перемещаются в электрическом поле постоянного тока по направлению к аноду. Наиболее быстро перемещаются альбумины, затем по порядку α_1 -, α_2 -, β - и γ -глобулины. На ход электрофореза влияет подвижность разделяемых веществ, зависящая от следующих факторов: 1) заряд (зависит от pH), размеры и форма молекул веществ; 2) электрическое поле – скорость движения ионов белка прямо пропорциональна силе тока и напряжению и обратно пропорциональна сопротивлению (зависит от типа и размеров носителя и ионной силы буфера); 3) буферный раствор – состав, концентрация, pH и ионная сила (зависит от концентрации присутствующих ионов и их заряда); 4) носитель – учитывается его гидрофильность и адсорбция веществ на его молекулах.

Материал для исследования

Сыворотка крови.

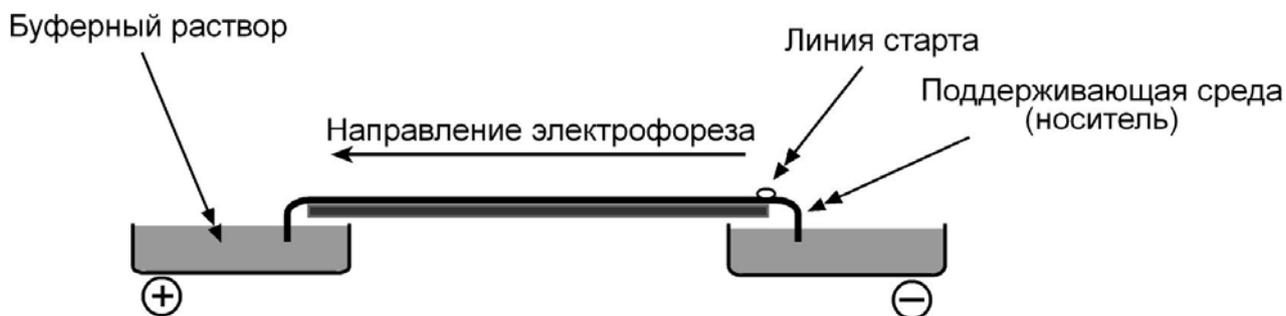
Оборудование

1) Прибор для электрофореза, 2) денситометр.

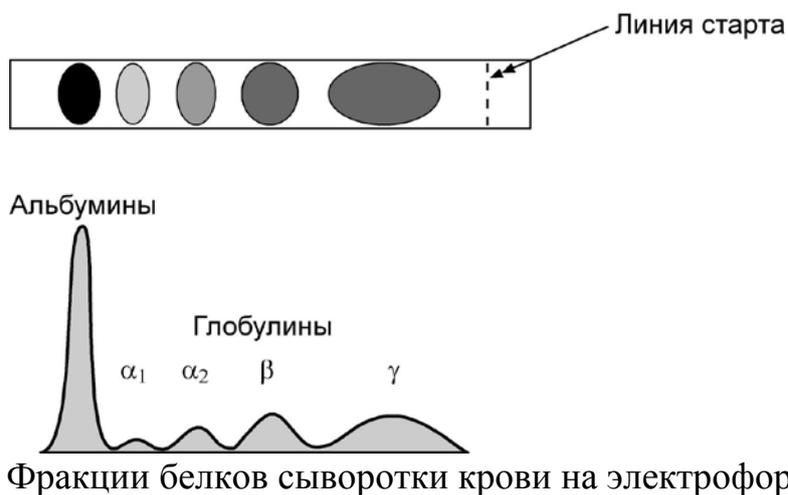
Проведение анализа (основные положения)

Образцы сыворотки равномерно наносят по линии старта на носитель (бумага,

ацетатцеллюлозная пленка). Носитель помещают в прибор для электрофореза, подают электрический ток. Буферный раствор, двигаясь в электрическом поле, захватывает молекулы белка. Молекулы с наибольшим отрицательным зарядом и наименьшим размером (альбумины) двигаются быстрее остальных, последними идут наиболее крупные и нейтральные (γ -глобулины). Через определённое время (для каждого прибора индивидуально) электрофорез завершают.



Полоски бумаги (или ацетатцеллюлозной пленки) отмывают от буферного раствора и окрашивают. Прокрашиваются участки, содержащие белок, причём площадь и интенсивность окраски зависят от содержания белка во фракции. Количественный учет окрашенных зон на электрофореграмме проводят при помощи денситометра, работа которого основана на пропускании луча света через движущуюся полосу носителя. При изменении интенсивности окраски носителя происходит «всплеск» и регистрируется наличие окрашенной зоны (белковой фракции). Одновременно современные приборы автоматически рассчитывают процентное соотношение белковых фракций.



Клинико-диагностическое значение

Альбумины

Снижение содержания альбуминов связано с понижением их синтеза – при врожденной анальбуминемии, белковом голодании, нарушении всасывания при пищеварении, тяжёлых поражениях печени (цирроз, дистрофии, некроз, активный гепатит, амилоидоз печени); или с повышением их катаболизма – при лихорадке, кахексии, тяжёлых инфекциях, панкреатите, коллагенозах, тиреоток-

сикозе, болезни Иценко-Кушинга (гипофункция надпочечников); или с их потерей через почки, поверхности ожогов, пищеварительный тракт; или с выходом альбумина из кровотока в межклеточное пространство при воспалениях.

α-Глобулины

Повышение содержания α_1 - и α_2 -глобулиновой фракции происходит при острых и подострых воспалительных процессах, некоторых злокачественных опухолях, травмах, так как эти фракции содержат большинство белков острой фазы (С-реактивный белок, церулоплазмин, гаптоглобин, α_1 -гликопротеин, α_1 -антитрипсин, α_2 -макроглобулин).

β-Глобулины

Повышение фракции β-глобулинов чаще всего связано с гиперлипопротеинемиями, так как большая доля белков этой фракции является β-липопротеинами (ЛПОНП и ЛПНП). На динамику этой фракции влияют трансферрин, гемопексин, компоненты системы комплемента.

γ-Глобулины

Содержание γ-глобулинов увеличивается при патологических состояниях, связанных с хроническим воспалительным процессом, так как фракция содержит иммуноглобулины G, A, M.

Лабораторная работа 3

Оценка альбуминовой фракции белков сыворотки крови

Реактивы

1) Рабочий раствор (бромкрезоловый зелёный в сукцинатном буфере, 2) 40 г/л стандартный раствор альбумина, 3) биуретовый реактив (раствор сульфата меди (II) и натрия гидроксида), 4) 70 г/л раствор альбумина (стандарт).

Материал для исследования

Сыворотка крови.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АЛЬБУМИНОВ

Принцип

При взаимодействии альбумина с красителем бромкрезоловым зелёным в слабокислой среде образуется комплекс зелёного цвета, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации альбумина в пробе.

Проведение анализа

Перед анализом рабочий раствор и стандартный раствор альбумина выдерживают 30 мин при комнатной температуре. Затем готовят опытную и стандартную пробы:

	Опыт, мкл	Стандарт, мкл
Сыворотка крови	20	—
Стандартный альбумин	—	20
Рабочий раствор	2000	2000

	Перемешивают, инкубируют 1 мин, измеряют оптическую плотность опыта и стандарта против рабочего раствора при длине волны 628 (578–640) нм в кювете 5,0 мм
--	---

Расчёт

$$\text{Содержание альбуминов [г/л]} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \cdot C_{\text{ст}}$$

где: $E_{\text{оп}}$ и $E_{\text{ст}}$ – оптическая плотность опытной и стандартной проб,
 $C_{\text{ст}}$ – концентрация альбумина в стандартном растворе (40 г/л).

Если концентрация альбумина выше 80 г/л, пробу разбавляют в 2 раза дистиллированной водой, повторяют анализ, результат умножают на 2.

Нормальные величины

Сыворотка крови 30–50 г/л

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ОБЩЕГО БЕЛКА

Принцип

Пептидная связь в щелочной среде образует с медью комплексное синевioletовое соединение, интенсивность окраски пропорциональна содержанию белка.

Проведение анализа

Рабочий и стандартный растворы должны быть комнатной температуры. Готовят опытную и стандартную пробы согласно таблице:

	Опыт, мкл	Стандарт, мкл
Сыворотка крови	20	—
Стандартный раствор	—	20
Биуретовый реактив	1500	1500
Инкубируют 10 мин, измеряют оптическую плотность опытной и стандартной проб против воды при длине волны 540 нм в кювете 5,0 мм		

Расчёт

$$\text{Содержание общего белка [г/л]} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \cdot C_{\text{ст}}$$

где: $E_{\text{оп}}$ и $E_{\text{ст}}$ – оптическая плотность опытной и стандартной проб,
 $C_{\text{ст}}$ – концентрация белка в стандартном растворе (70 г/л).

Нормальные величины

Сыворотка крови 65–83 г/л

Расчёт процентного содержания белков альбуминовой фракции в сыворотке крови производят по формуле:

$$\text{Фракция альбуминов [\%]} = 100 \text{ А/Б ,}$$

где: А – концентрация альбуминов в сыворотке крови (г/л), Б – концентрация общего белка в сыворотке крови (г/л), 100 – коэффициент пересчёта в %.

Нормальные величины

Альбумины сыворотки крови	49–62 %
мужчины	48,9–61,7 %
женщины	48,8–54,6 %

Клинико-диагностическое значение

Изменения концентрации альбуминов в плазме крови. Снижение содержания альбуминов (если исключить неполноценное питание, нарушение всасывания в кишечнике, большую потерю белка организмом) чаще бывает при выраженном нарушении синтетической функции печени. Максимальное снижение – при портальном циррозе и жировой дистрофии печени. Альбумины первыми теряются при нарушении функции почек, первыми выходят в ткани при отёках (концентрация альбуминов в плазме крови <20 г/л сопровождается отёками).

Альбумины – отрицательные реактанты острой фазы: диспротеинемии на фоне неизменной концентрации общего белка формируются при воспалении за счёт снижения альбуминов и роста белков острой фазы (глобулины). При парапротеинемиях или иных патологиях рост глобулиновых фракций крови происходит также за счёт снижения содержания альбуминов.

Изменения концентрации общего белка в плазме крови могут иметь как абсолютный, так и относительный характер. Изменения абсолютного характера являются следствием колебаний содержания белка в плазме крови, в свою очередь относительные изменения зависят от объёма крови, то есть наблюдаются при обезвоживании или гипергидратации.

Гиперпротеинемия. *Истинный рост содержания белка* в крови чаще всего связан с увеличением фракции глобулинов при острых инфекциях (синтез белков острой фазы), хронических инфекциях (за счёт γ -глобулинемии), миеломной болезни, лимфогрануломатозе, саркоидозе. *Относительная гиперпротеинемия* связана с потерей внутрисосудистой жидкости в итоге профузных поносов (например, холере), усиленном потоотделении, неукротимой рвоте, несахарном диабете, тяжёлых и обширных ожогах, генерализованных перитонитах.

Гипопротеинемия часто связана с уменьшением фракции альбуминов крови. *Истинная (абсолютная) гипопротеинемия:* при недостаточном потреблении белка с пищей – заболевания желудочно-кишечного тракта, сужение пищевода, частичное/полное голодание; снижении синтеза белка – дисбаланс пищи по аминокислотам, хронические гепатиты, интоксикации, злокачественные опухоли, лечение кортикостероидами; усиленном распаде белка – кахексия, тяжёлые инфекции, длительные воспалительные процессы, лихорадочные состояния, тиреотоксикозы; потере белка – нарушения проницаемости стенок капилляров, кровоизлияния, ожоги, острые и хронические кровотечения, нефротический синдром. *Относительная гипопротеинемия* связана с нарушением водного баланса – гипергидратация при гиперальдостеронизме; со снижением экскреции солей при почечной недостаточности, а также использовании для питья морской воды и неадекватных инфузиях солевых растворов.

Оформление работы

Указывают принципы методов, регистрируют результаты по общему белку и альбумину, производят расчёты с вычислением процентного содержания фракции альбуминов от общего белка сыворотки крови и альбуминового-глобулинового соотношения, делают вывод о наличии/отсутствии патологий, отмечают клиническое значение.

Лабораторная работа 4

Проведение проб на коллоидоустойчивость белков сыворотки крови

Устойчивость белков сыворотки крови зависит от заряда и наличия гидратной оболочки. Нарушение коллоидной устойчивости белков под влиянием различных агентов проявляется сначала склеиванием (коагуляцией) молекул, а затем выпадением в осадок. В первую очередь осаждаются более крупные и менее заряженные белки – глобулины. В норме устойчивость сывороточных белков зависит от соотношения количества альбуминов и глобулинов.

Материал для исследования

Сыворотка крови.

ТИМОЛОВАЯ ПРОБА

Принцип

Сывороточные β - и γ -глобулины, липопротейны осаждаются тимоловым реактивом при $pH=7,55$ с образованием глобулин-тимол-липидного комплекса.

Реактивы

1) Тимоловый буфер, $pH 7,55-7,6$; 2) шкала сравнения: калибровочные растворы с мутностью разной интенсивности (перед использованием их перемешивают)

№ пробы	Единицы помутнения, S-H (по авторам: Shank-Haagland)
1	5
2	10
3	15
4	20

Проведение анализа

Берут 0,05 мл сыворотки крови, добавляют 3,0 мл тимолового буфера, перемешивают и инкубируют 15 мин при комнатной температуре, перемешивают и сравнивают со шкалой. Результат выражают в единицах помутнения S-H.

Нормальные величины:

Сыворотка крови 0–4 ед. S-H

Практическое значение

Как и все коагуляционные тесты, тимоловая проба неспецифична. Однако по сравнению с другими коллоидными пробами она более приемлема для функционального исследования печени при дифференциальной диагностике. При поражении паренхимы печени (инфекционный, токсический гепатит) уже в преджелтушной стадии или при безжелтушной форме в 90–100% случаев проба выше нормы. У здоровых лиц при механической желтухе, иной патоло-

гии печени, нарушении функции других органов тимоловая проба в пределах нормы.

ОСАДОЧНАЯ ПРОБА ВЕЛЬТМАНА В МОДИФИКАЦИИ ТАЙФЛЯ

Принцип

При добавлении к сыворотке крови раствора CaCl_2 и нагревании до кипения снижается коллоидоустойчивость белков из-за снижения электрического заряда под действием электролита и они выпадают в осадок (первыми – γ -глобулины).

Реактивы

0,5% раствор CaCl_2 .

Проведение анализа

В пробирку добавляют 0,1 мл сыворотки, 4,9 мл дистиллированной воды и 0,1 мл раствора CaCl_2 , встряхивают, нагревают до однократного закипания и охлаждают. Если хлопья в пробирке не обнаруживаются, то добавляют еще 0,1 мл раствора хлорида кальция и вновь нагревают до кипения. Процедуру повторяют до выпадения хлопьевидного осадка. Учитывают объём раствора CaCl_2 , пошедший на образование хлопьевидного осадка сывороточных белков, и определяют состояние по коагуляционной ленте Вельтмана по схеме:

№ пробы	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CaCl_2 , мл	1,0	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
	Сдвиг влево — обусловлен увеличением содержания α - и β -глобулинов							Сдвиг вправо — при росте содержания γ -глобулинов		
Клинико-диагностическое значение	Ревматизм, активный туберкулез, перитонит, нефроз, острые инфекции, опухоли, сахарный диабет							Фиброзы дистрофия печени, гепатит, цирроз, гемолиз, плеврит, пневмония, туберкулез, остеомиелит		

Нормальные величины

Сыворотка крови 0,4–0,5 мл раствора

Оформление работы

Указывают принцип метода, регистрируют результаты, сравнивают с нормальными величинами, делают выводы по обоим осадочным пробам.

Вопросы для самоконтроля

1. Клеточные, неклеточные (органические, неорганические) компоненты крови. Плазма и сыворотка крови.
2. Физико-химические свойства и функции белков плазмы крови. Общий белок и его фракции при электрофорезе, представители фракций. Гипо-, гипер-, пара-, диспротеинемии, причины и значение в клинике. Протеинограммы при заболеваниях (острое и хроническое воспаление, рак и др.)
3. Общая характеристика, происхождение и свойства ферментов плазмы кро-

ви. Органоспецифичные и собственно плазменные ферменты. Энзимодиагностика заболеваний. Ингибиторы протеиназ плазмы в лечении заболеваний

4. Понятие о формах поступления и выведения азота из организма. Образование, транспортные формы и утилизация аммиака в организме.
5. Остаточный азот и его фракции в сыворотке крови. Клиническое значение определения общего показателя остаточного азота и отдельных фракций (мочевина, мочевая кислота, креатин-креатинин и др.), клиренс креатинина.

2. ЭРИТРОЦИТ. ОБМЕН ЖЕЛЕЗА И ГЕМОПРОТЕИНОВ

Актуальность

Эритроцит необходим для поддержания жизненно важных функций организма, что определяет особенности его структуры и метаболизма (гликолиз, активность пентозофосфатного пути), механизмы защиты от избыточного воздействия кислорода. Главным белком эритроцита является гемоглобин. Широкое разнообразие биологически важных функций гемоглобина и других гемопротеинов (цитохромов, пероксидаз, миоглобина) вызывает необходимость изучения роли этих белков в метаболизме. Состояния, связанные с нарушением синтеза и распада гема, приводят к развитию заболеваний крови и печени.

Цель

1. Изучение особенностей обмена эритроцита, реакций синтеза и распада гема, метаболизма билирубина.
2. Освоение методов определения концентрации основных показателей пигментного обмена – гемоглобина в крови, билирубина в сыворотке крови и моче, желчных пигментов в моче.

Вопросы для самоподготовки

1. Обмен железа в организме: потребность, всасывание, транспорт, железосвязывающие белки, запасная форма. Пищевые источники. Симптомы и клинические проявления недостаточности железа. Понятие гемохроматоза.
2. Функции эритроцитарных белков – спектрина, гликофорина, белка полосы 3. Особенности окисления глюкозы в эритроците. Механизмы защиты мембраны эритроцита от окисления.
3. Строение гема, реакции и основные этапы его синтеза. Регуляция синтеза гема и гемоглобина.
4. Причины порфирий, их клинические проявления, основы лечения порфирий. Талассемии, их виды и причины.
5. Строение наиболее распространённых в организме гемсодержащих белков (гемоглобин, миоглобин, цитохромы, каталаза, пероксидаза), их функции и локализация.
6. Патологические и физиологические типы гемоглобина (оксигенированный, гликозилированный, серповидно-клеточный гемоглобин; карбо-, карбокси- и метгемоглобин). Значение определения концентрации окси- и карбогемогло-

бина, гликозилированного гемоглобина.

7. Реакции, происходящие в эритроците в капиллярах легких и тканей (схемы).
8. Механизмы транспорта углекислого газа. Транспортные формы углекислого газа, связь CO_2 с гемоглобином, роль карбоангидразы. Роль эритроцита в изменении концентрации бикарбонат-ионов плазмы.
9. Механизм транспорта O_2 . Связывание гемоглобина с кислородом, нормальная степень насыщения гемоглобина кислородом, влияние температуры, величины рН, концентрации CO_2 на сродство гемоглобина к O_2 , регуляция. Кооперативность протомеров Hb, эффект Бора, роль 2,3-дифосфоглицерата.
10. Кривые насыщения гемоглобина кислородом или диссоциации гемоглобина. Причины S-образного характера кривой диссоциации.
11. Распад гемоглобина и гема в ретикулоэндотелиальной системе.
12. Непрямой (свободный) билирубин, его строение, реакции образования. Дальнейшая судьба непрямого билирубина.
13. Прямой (связанный) билирубин, его строение, реакции образования, дальнейшая судьба. Роль фермента УДФ-глюкуронилтрансферазы. Выведение конечных продуктов распада гема.
14. Состояния, связанные с избыточным распадом гемоглобина. Причины гемолитической желтухи, её виды и лабораторные критерии.
15. Состояния, связанные с нарушениями оттока желчи. Причины обтурационной желтухи и её лабораторные критерии.
16. Состояния, связанные с недостаточностью функции гепатоцитов. Причины паренхиматозной желтухи и её лабораторные критерии.
17. Виды физиологической и патологической желтухи новорожденных.
18. Нарушения выведения билирубина – наследственные (синдромы Жильбера-Мейленграхта, Криглера-Найара, Дубина-Джонсона) и приобретенные (избыток эстрогенов молока, инфекционные и токсические причины). Представление о механической желтухе при муковисцидозе, болезни Нимана-Пика, гипоплазии желчных путей.

Темы для реферативных сообщений

1. Железодефицитные состояния: причины, проявления, диагностика, последствия, основы лечения.
2. Врожденные и приобретенные метгемоглобинемии: причины, недостаточность НАДН-метгемоглобинредуктазы, клинические проявления, лечение.
3. Порфирии: классификация, причины, патогенез, клинические проявления, основы лечения.

Самостоятельная работа

Дополнить схему углеводно-энергетического обмена (темы 5–7), представив реакции синтеза 2,3-дифосфоглицерата в эритроците, связанные с гликолизом.

Лабораторная работа 1

Определение концентрации гемоглобина в крови

Актуальность

Концентрация гемоглобина в крови является одним из важнейших показателей организма. На поддержание этого показателя и своевременную доставку кислорода в ткани направлено множество регуляторных механизмов. При недостатке железа в организме концентрация гемоглобина в крови уменьшается в последнюю очередь, когда в организме уже понижено содержание всех иных железосодержащих белков (трансферрина в крови, ферритина в тканях и др.) и гемопротейнов (миоглобина в мышцах, цитохромов в дыхательной цепи и цепях митохондриального окисления и др.). При повышении поступления железа в организм концентрация гемоглобина в крови восстанавливается в первую очередь, а уже затем восстанавливается общая железосвязывающая способность сыворотки крови и постепенно нарастают запасы железа в тканях.

Принцип

Гемоглобинцианидный метод основан на способности гемоглобина при взаимодействии с гексацианоферратом калия (красная кровяная соль) окисляться в метгемоглобин, образующий с ацетонциангидрином окрашенный гемоглобинцианид, интенсивность его окраски пропорциональна количеству гемоглобина.

Реактивы

1) Трансформирующий реактив (смесь растворов ацетонциангидрина, карбоната натрия Na_2CO_3 , гексацианоферрата калия $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), 2) 150 г/л стандартный раствор гемоглобинцианида.

Материал исследования

Свежая кровь.

Проведение анализа

	Опыт, мл	Стандарт, мл
Кровь	0,02	—
Стандартный раствор	—	0,02
Трансформирующий раствор	5,0	5,0
	Инкубируют 10 мин, измеряют оптическую плотность опытной и стандартной проб против воды при длине волны 540 нм (зелёный светофильтр) в кювете 10 мм	

Расчёт

$$\text{Содержание гемоглобина [г/л]} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \cdot C_{\text{ст}}$$

где: $E_{\text{оп}}$ и $E_{\text{ст}}$ – оптическая плотность опытной и стандартной проб,
 $C_{\text{ст}}$ – концентрация гемоглобина в стандартном растворе.

Нормальные величины

Свежая кровь	женщины	120–140 г/л
	мужчины	130–160 г/л

Клинико-диагностическое значение

Снижение концентрации гемоглобина наблюдается при анемиях – железодефицитной (до 60 г/л), геморрагической, гипопластической, гемолитической, В₁₂-дефицитной. Увеличение концентрации гемоглобина наблюдается при миелопролиферативных заболеваниях – эритремии (до 210 г/л), симптоматических эритроцитозах – пролиферации элементов эритропоэза, при обезвоживании.

Оформление работы

Указывают принцип и диагностическую ценность метода, регистрируют результаты, выполняют расчёты, делают вывод о наличии/отсутствии патологии.

Лабораторная работа 2

Определение концентрации общего билирубина и его фракций в сыворотке крови

Актуальность

Определение концентрации билирубина и его фракций в крови служит важным критерием при определении типа желтухи и выбора стратегии лечения.

Принцип

Сульфаниловая кислота с азотистым натрием дает диазофенилсульфоновую кислоту, образующую с билирубином окрашенные азопигменты (диазореакция Эрлиха). Связанный (прямой) билирубин реагирует быстро, его содержание оценивают по начальной интенсивности окраски. Несвязанный билирубин вступает в реакцию после добавления акселератора (кофеина), высвобождающего билирубин из комплекса с белками и ускоряющего реакцию азосочетания.

Материал исследования

Сыворотка крови.

Реактивы

1) 5 мкмоль/л стандартный раствор билирубина; 2) сульфаниловая кислота в HCl (реагент 1); 3) раствор NaNO₂ (реагент 2); 4) кофеиновый реактив (реагент 3); 5) 0,9% раствор NaCl; 6) буферный раствор (реагент 4).

Проведение анализа

Реагенты	Общий билирубин, мл	Прямой билирубин, мл	Стандарт, мл	Контроль, мл
Сульфаниловая кислота	0,2	0,2	0,2	—
NaNO ₂	1 капля	1 капля	1 капля	—
Кофеиновый реактив	1,0	—	1,0	1,0
NaCl	—	1,0	—	0,2
Сыворотка крови	0,2	0,2	—	0,2
Стандарт билирубина	—	—	0,2	—
Перемешивают и инкубируют 10 минут				
Буферный раствор	1,0	1,0	1,0	1,0

Измеряют экстинкцию стандартной пробы и пробы на прямой билирубин против контроля при 540 нм (зелёный светофильтр) в кювете 5 мм. Ещё через 10 мин измеряют экстинкцию стандартной пробы и пробы на общий билирубин.

Расчёт

Рассчитывают концентрацию общего и прямого билирубина по формуле:

$$\text{Билирубин [мкмоль/л]} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \cdot C_{\text{ст}}$$

где $E_{\text{оп}}$ и $E_{\text{ст}}$ – оптическая плотность опытной и стандартной проб,
 $C_{\text{ст}}$ – концентрация билирубина в стандартном растворе, 5 мкмоль/л

Непрямой билирубин [мкмоль/л] = общий билирубин – прямой билирубин

Нормальные величины

Сыворотка крови	общий билирубин	8,5–20,5 мкмоль/л
	прямой билирубин	2,2–5,1 мкмоль/л

Клинико-диагностическое значение

В таблице отражены сдвиги содержания основных пигментов в сыворотке крови, моче и кале людей при различных типах желтухи (↑ – увеличение, ↓ – снижение, N – нормальные значения):

	Типы желтухи		
	Гемолитическая	Паренхиматозная	Обтурационная
Билирубин крови			
- Общий	↑	↑	↑↑
- Непрямой	↑↑	↑	N или ↑
- Прямой	N или ↑	↑	↑↑
Билирубин мочи	N	N или ↑	↑
Уробилин мочи	↑↑	↑	↓
Стеркобилин кала	↑↑	N или ↓	Отсутствует

Накопление билирубина в крови свыше 43 мкмоль/л ведёт к его связыванию эластическими волокнами кожи и конъюнктивы, проявляется желтухой. Для дифференциальной диагностики типа желтухи определяют, за счёт какой фракции билирубина возникает билирубинемия.

Гемолитическая (надпечёночная) желтуха – ускорено образование билирубина в итоге гемолиза. Гипербилирубинемия развивается за счёт фракции непрямого билирубина. В моче резко возрастает содержание уробилина, билирубина нет. В кале увеличено содержание стеркобилина.

Данный тип желтухи может развиваться при V_{12} -дефицитной анемии, гемолитических анемиях различного происхождения (порфирии, несовместимость крови, дефект глюкозо-6- фосфатдегидрогеназы, лекарства).

Паренхиматозная (печёночно-клеточная) желтуха – нарушено извлечение билирубина печеночными клетками, его конъюгирование и выведение. Гипербилирубинемия за счёт обеих фракций: непрямого билирубин возрастает за счёт

функциональной недостаточности гепатоцитов или снижения их количества, а прямой – за счёт цитолиза гепатоцитов. В моче определяется билирубин, умеренно увеличена концентрация уробилина. В кале уровень стеркобилина в норме или снижен. Паренхиматозный тип желтухи отмечается при вирусных и иных формах гепатитов, циррозе, опухолях, жировой дистрофии печени и других состояниях.

Механическая (подпечёночная) желтуха развивается вследствие нарушения оттока желчи при закупорке желчного протока. Из-за застоя желчи растягиваются желчные капилляры, растёт их проницаемость. Не имея оттока в жёлчь, прямой билирубин поступает в кровь (гипербилирубинемия). В тяжёлых случаях переполнение гепатоцитов прямым билирубином нарушает конъюгацию с глюкуроновой кислотой, в крови растёт уровень несвязанного билирубина. В моче резко повышен уровень билирубина. В кале нет стеркобилина. Такую желтуху выявляют при желчно-каменной болезни, опухолях поджелудочной железы, гельминтозах.

Оформление работы

Указывают принцип метода, регистрируют результаты, производят расчёты, делают вывод о наличии/отсутствии возможной патологии.

Лабораторная работа 3

Обнаружение билирубина и желчных пигментов в моче

Реактивы

1) Диагностические полоски «Билифан», 2) концентрированная H_2SO_4 , 3) концентрированная HNO_3 с примесью HNO_2 , 4) сухой порошок аммония молибдата, 5) 1% спиртовой раствор I_2 .

Материал для исследования

1) Нормальная моча, 2) патологическая моча с желчью.

ЭКСПРЕСС-МЕТОД

Принцип

Полуколичественное определение билирубина в моче диагностическими полосками «Билифан» основано на качественной реакции, дающей продукты с характерным розовым окрашиванием.

Проведение анализа

Диагностическую полоску погружают в мочу и немедленно вынимают. Через 1 мин сравнивают окраску зоны индикации с цветной шкалой на этикетке.

Примерную концентрацию билирубина в моче определяют по оттенкам зоны индикации в соответствии с таблицей:

Обозначения на шкале	Содержание билирубина	
	мкмоль/л	мг/л
1	5–10	3–6
2	10–21	6–12
3	21–41	12–24

- цитов: белки, мишени окисления, роль витаминов-антиоксидантов, НАДФН.
2. Гемоглобин как гемопротейн, типы гемоглобина. Транспорт газов эритроцитом, участие O_2 и CO_2 (схемы: в капиллярах, лёгких и тканях), кооперативность, эффект Бора. Гликозилированный гемоглобин и сахарный диабет.
 3. Функции и локализация других гемопротейнов (миоглобин, цитохромы, пероксидаза и каталаза). Гемопротейны и гипоксия.
 4. Железо, роль, токсичность. Обмен Fe, нарушения (анемия, гемохроматоз).
 5. Синтез и распад гема, гемоглобина, регуляция и нарушения. Роль РЭС, печени, почек в обмене гемоглобина. Заболевания: талассемии, порфирии, гемоглобинозы и др.
 6. Желтуха, виды, причины, диагностика. Прямой и непрямой билирубин.

3. НЕОРГАНИЧЕСКИЕ ВЕЩЕСТВА КРОВИ. КИСЛОТНО-ОСНОВНОЕ СОСТОЯНИЕ

Актуальность

Кровь занимает особое место в метаболизме благодаря ряду специфических функций, принадлежащих её компонентам. Незаменима роль крови в газообмене и регуляции кислотно-основного состояния организма, нарушения которых часто встречаются в клинической практике.

Цель

1. Изучить кислотно-основное состояние крови, механизмы его обеспечения.
2. Освоить методы оценки буферной ёмкости сыворотки крови, содержания хлоридов в сыворотке крови и моче, показателя рН мочи и их клинικο-диагностическое значение.

Вопросы для самоподготовки

1. Электролиты плазмы крови:
 - макроэлементы (Na, K, Ca, P, Fe, Cl), распределение и значение в организме, нормальные концентрации в плазме крови и факторы, от которых зависит их концентрация в плазме крови;
 - микроэлементы (J, Cu, Zn, Co, Se), примеры участия в обмене веществ.
2. Роль эритроцита в изменении концентрации бикарбонат-ионов плазмы, карбоангидраза.
3. Механизм транспорта кислорода. Связывание кислорода с гемоглобином. Кривая насыщения гемоглобина кислородом, диссоциации гемоглобина и кислорода.
4. Схема реакций, происходящих в эритроците, в капиллярах лёгких и тканей.
5. Показатели кислотно-основного состояния, нормальные величины (Приложение).
6. Химические механизмы регуляции кислотно-основного состояния. Каким образом работают буферные системы крови – фосфатная, белковая, бикарбонатная, гемоглобиновая. Химические реакции. Буферная ёмкость крови, клинικο-диагностическое значение и нормальные показатели.

7. Характеристика и механизмы основных физиологических систем компенсации нарушения кислотно-основного состояния, роль лёгких и почек. Определение рН мочи, клинико-диагностическое значение.
8. Значение печени и костной ткани в реакциях компенсации нарушений КОС. Механизмы их работы.
9. Влияние секреции желудка и поджелудочной железы на кислотно-основное состояние организма. Роль печени. Определение концентрации ионов хлора в сыворотке крови и моче. Клинико-диагностическое значение и нормальные величины.
10. Основные виды нарушений кислотно-основного состояния – респираторный (дыхательный) ацидоз и алкалоз, метаболический ацидоз и алкалоз, причины, их вызывающие. Изменение показателей кислотно-основного состояния при данных нарушениях. Способы компенсации нарушений.
11. Причины сдвигов кислотно-основного равновесия при нижеперечисленных состояниях, способы их химической и физиологической компенсации:

-сахарный диабет,	-хроническая почечная недостаточность
-пневмония,	(снижение функции почек),
-тканевая гипоксия,	-черепно-мозговая травма с возбуждением
-приступ бронхиальной астмы,	дыхательного центра,
-хронический бронхит,	-подъём высоко в горы,
-отравление этанолом,	-правожелудочковая сердечная недоста-
-неукротимая рвота,	точность.
-диарея,	

Темы для реферативных сообщений

1. Сочетанные нарушения кислотно-основного состояния.
2. Методы определения показателей КОС в клинико-лабораторной практике.

Лабораторная работа 1

Определение буферной емкости сыворотки крови

Актуальность

Сила буферных систем определяется их буферной ёмкостью, т.е. количеством молей кислоты или основания, которое необходимо добавить к буферному раствору, чтобы сместить его активную реакцию на единицу.

Принцип метода

Для определения буферной емкости сыворотки в отношении кислых продуктов её титруют кислотой с индикатором метилоранж. Для определения буферной ёмкости в отношении щёлочных продуктов пробу сыворотки титруют щёлочью с индикатором фенолфталеином.

Реактивы

1) 0,1 М раствор HCl, 2) 0,1 М раствор NaOH, 3) 0,5% спиртовой раствор метилоранжа, 4) 0,5% спиртовой раствор фенолфталеина.

Материал для исследования

Сыворотка крови.

Проведение анализа

В 1-ю коническую колбу вносят 1 мл сыворотки крови, 2–3 капли 0,5% раствора метилоранжа. В сыворотке крови (рН выше 4,5) метилоранж окрашивается в жёлтый цвет. Содержимое колбы титруют 0,1 М раствором HCl до изменения цвета индикатора на красный. Отмечают объём, пошедший на титрование.

Во 2-ю коническую колбу вносят 1 мл сыворотки крови, 2–3 капли 0,5% раствора фенолфталеина. В сыворотке крови (при рН ниже 8,2) смесь остается бесцветной. Содержимое колбы титруют из бюретки 0,1 М раствором NaOH до слабо-розового окрашивания. Отмечают объём, пошедший на титрование.

Расчёт

Рассчитывают отношение (К) пошедшего на титрование количества соляной кислоты (в мл) к количеству раствора NaOH (в мл), пошедшего на титрование.

$$K = \text{HCl (мл)} : \text{NaOH(мл)}$$

Нормальные величины

Кислота : щёлочь = 20 : 1

Клинико-диагностическое значение

Возрастание соотношения в пользу HCl (увеличение её затрат) свидетельствует о недостаточности кислых веществ в крови и состоянии алкалоза. Увеличение количества израсходованного раствора NaOH указывает на избыток кислых эквивалентов в крови и состояние ацидоза.

Виды нарушений кислотно-основного состояния:

Выделяют четыре основных вида нарушений кислотно-основного состояния: респираторный ацидоз и алкалоз, метаболический ацидоз и алкалоз. Дополнительно среди этих нарушений обычно различают острые и хронические состояния, компенсированные и декомпенсированные состояния.

Метаболический ацидоз – самая частая и тяжёлая форма нарушения кислотно-основного состояния. В основе его лежит накопление в организме нелетучих кислых продуктов (молочная, β -оксимасляная и ацетоуксусная кислоты и др.). Причины: а) избыточное образование органических кислот – декомпенсированный сахарный диабет (кетоацидоз), врожденные нарушения метаболизма, голодание и гипоксия (лактацидоз), общий наркоз, отравление этанолом, метанолом, заболевания печени, лёгочная и сердечная недостаточность, нарушения кровообращения, инфекции, анемии; б) нарушение выведения кислых продуктов – острая и хроническая почечная недостаточность, сопровождающаяся задержкой ионов NH_4^+ , SO_4^{2-} , HPO_4^{2-} ; в) потеря бикарбоната – почечная канальцевая недостаточность, диарея; г) избыточное введение кислот – с токсичными жидкостями или при отравлении лекарственными препаратами.

Респираторный ацидоз характеризуется увеличением концентрации углекислоты и повышением парциального давления CO_2 в крови выше 50 мм рт.ст. Причины: а) высокая концентрация CO_2 во вдыхаемом воздухе; б) недостаточность лёгочной вентиляции вследствие угнетения дыхательного центра, стеноза дыхательных путей, отёка гортани, хронического бронхита, уменьшения активной массы лёгких.

Метаболический алкалоз – состояние дефицита водородных ионов в крови в

сочетании с избытком оснований. Часто сопровождается снижением содержания калия в крови. Причины: а) потеря HCl при рвоте; б) потеря H^+ в почках, избыток минералокортикоидов; в) накопление бикарбонатов при передозировке нейтрализующих ацидоз препаратов; г) дефицит K^+ .

Респираторный алкалоз характеризуется снижением pCO_2 ниже 36 мм рт.ст. и повышением pH выше 7,5 при неадекватно высокой лёгочной вентиляции по сравнению с продукцией углекислоты в организме. Причины: а) возбуждение дыхательного центра – опухоль, черепно-мозговая травма, энцефалит; б) гипервентиляция при гипоксии – горная болезнь, пониженное содержание O_2 во вдыхаемом воздухе.

Изменения показателей кислотно-основного состояния при ацидозе и алкалозе отражены в таблице (\uparrow – увеличение, \downarrow – снижение).

Тип нарушения		pH	pCO_2	Избыток оснований	$[\text{HCO}_3^-]$
Метаболический	ацидоз	\downarrow	Норма (или	\downarrow	\downarrow
	алкалоз	\uparrow	Норма (или	\uparrow	\uparrow
Респираторный	ацидоз	\downarrow	\uparrow	Норма (или	Норма (или
	алкалоз	\uparrow	\downarrow	Норма (или	Норма (или

*Примечание: * – при метаболических нарушениях изменение pCO_2 компенсаторное, ** – при респираторных нарушениях сдвиги избытка оснований и $[\text{HCO}_3^-]$ являются компенсаторными.*

Оформление работы

Указывают принцип метода, регистрируют результаты, делают вывод о возможной патологии.

Лабораторная работа 2 **Определение величины pH мочи**

Актуальность

Реакция мочи зависит от количества свободных водородных ионов H^+ , образующихся в результате диссоциации органических и неорганических кислот, которые возникают во время катаболических процессов в организме. Ионы H^+ в дистальной части почечного канальца связываются с буферными основаниями, только их небольшая часть выводится с мочой в свободном виде. Водородный показатель (pH) не является количественным, а лишь указывает на реакцию мочи (в норме нейтральная или слабокислая).

Показатель pH у практически здоровых людей изменяется в довольно широких пределах в зависимости от режима питания и состава потребляемой пищи. Прием преимущественно мясной пищи ведет к окислению мочи, а молочно-растительная диета и употребление значительного количества щелочной минеральной воды – к увеличению pH . Помимо характера пищи на pH мочи влияют различные метаболические процессы, происходящие в организме, и функциональное состояние канальцев почек. Поэтому реакция мочи имеет ограниченное клиническое значение.

Принцип метода

Определение проводят с помощью индикаторной бумаги или диагностических полосок, имеющих тест-зону для определения рН. Зона индикации диагностических полосок содержит смешанный кислотно-основной индикатор с переходом оранжевой окраски в жёлтую и далее в зелёную до появления синего цвета в диапазоне рН 5,0–9,0.

Материал для исследования

Моча.

Проведение анализа

Не прикасаясь руками к зоне индикации, берут из упаковки диагностическую полоску, погружают зону индикации на 1–2 сек в исследуемую мочу. Капли мочи удаляют, проводя полоской по краю сосуда. Полоски оставляют в горизонтальном положении. Через 1 мин по цветной шкале на упаковке определяют величину рН.

Нормальные величины

Моча	5,0–7,0
------	---------

Влияющие факторы. При белковом питании реакция мочи кислая, при растительной диете реакция мочи становится щёлочной. У вегетарианцев рН мочи около 7,0. Кислая реакция мочи обусловлена, прежде всего, ионами H_2PO_4^- и NH_4^+ , щёлочная – HCO_3^- .

Клинико-диагностическое значение

Щёлочная реакция мочи отмечается при циститах и пиелитах, сильной рвоте, введении бикарбоната натрия и употреблении щелочных минеральных вод. Резко кислая реакция мочи наблюдается при лихорадочных состояниях, сахарном диабете, голодании и др.

Кислотность мочи определяет реализацию возможности образования тех или иных типов мочевых камней. Мочекислые камни (уратные) чаще всего образуются при рН ниже 5,5, оксалатные – при рН 5,5–6,0, кальций-фосфатные – при рН 7,0–7,8.

Оформление работы

Указывают принцип метода, регистрируют результат, делают вывод о возможной патологии.

Лабораторная работа 3

Определение содержания хлоридов в сыворотке крови и моче

Принцип

В присутствии ионов хлора в кислой среде тиоцианат ртути образует тиоцианат-ионы, образующие окрашенный комплекс с ионами железа Fe^{3+} . Интенсивность окраски пропорциональна концентрации хлорид-ионов в пробе и определяется колориметрически.

Материал для исследования

1) Сыворотка крови, 2) моча в разведении 1:2.

Реактивы

1) Рабочий реагент (смесь 2 ммоль/л тиоцианата ртути $\text{Hg}(\text{SCN})_2$, 30 ммоль/л нитрита железа $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, 4 ммоль/л азотной кислоты HNO_3), 2) 100 ммоль/л раствор NaCl (стандарт).

Проведение анализа

	Опыт 1, мл	Опыт 2, мл	Стандарт, мл
Сыворотка	0,01	-	-
Моча, разведение 1:2	-	0,01	-
Раствор NaCl	-	-	0,01
Рабочий реагент	2,0	2,0	2,0

Пробы перемешивают, инкубируют 5 мин, измеряют экстинкцию стандартной и опытных проб против воды при длине волны 490 нм (синий светофильтр) в кювете 0,5 см.

Расчёт

$$\text{Содержание хлоридов в сыворотке крови [ммоль/л]} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \cdot C_{\text{ст}}$$

$$\text{Содержание хлоридов в моче [ммоль/сут]} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \cdot C_{\text{ст}} \cdot 2 \cdot D$$

где: $E_{\text{оп}}$ и $E_{\text{ст}}$ – оптическая плотность опытных проб и стандартной проб, $C_{\text{ст}}$ – концентрация хлорида в стандартном растворе, 2 – разведение мочи, D – величина диуреза (1300–1500 мл/сут).

Нормальные величины

Сыворотка 97–108 ммоль/л
 Моча 120–240

Клинико-диагностическое значение

Сыворотка крови. Содержание ионов хлора повышается при обезвоживании (недостаточное поступление жидкости), при заболеваниях почек, декомпенсации сердца, гипервентиляции (респираторный алкалоз), гипофункции коры надпочечников. Снижение выявляется при обезвоживании (потере жидкости – рвота, понос, потоотделение), стенозе привратника, почечном диабете, желудочной гиперсекреции, недостаточности коры надпочечников, увеличении объёма внеклеточной жидкости, инфекционных заболеваниях и других патологиях. Значительная гипохлоремия может привести к компенсаторному росту фракций остаточного азота с целью сохранения постоянства осмотического давления.

Моча. Концентрация ионов Cl^- нарастает при недостаточности коры надпочечников, нефритах, применении диуретиков; снижается при большой потере хлора через ЖКТ, голодании, синдроме Иценко-Кушинга, сильном потоотделении.

Оформление работы

Указывают принцип метода, регистрируют результаты, делают расчёты и выводы о возможной патологии.

Вопросы для самоконтроля

1. Неорганические вещества крови, разнообразие, значение.
2. Кислотно-основное состояние, основные параметры в норме.
3. Буферные системы организма, буферная ёмкость.
4. Гемоглобин: роль в транспорте кислорода и углекислого газа, сопряженная с поддержанием КОС. Пути транспорта и транспортные формы CO_2 .
5. Быстрые неполные и долговременные полные механизмы компенсации нарушений КОС (буферные системы, лёгкие, почки).
6. Детоксикационная функция почек по утилизации аммиака в организме, сопряжение аммионогенеза с ацидогенезом и реабсорбцией натрия.
7. Образование соляной кислоты в желудке, метаболический алкалоз.
8. Метаболические и газовые сдвиги КОС. Основной сдвиг и его компенсация. Нарушения КОС при заболеваниях.

4. ВОДНО-СОЛЕВОЙ ОБМЕН.

НОРМАЛЬНЫЕ И ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ КОМПОНЕНТЫ МОЧИ

Актуальность

Почки участвуют в регуляции водно-солевого баланса, поддержании кислотно-основного состояния, осмотического давления жидкостей организма, кровяного давления, стимуляции эритропоэза, процессах детоксикации и выведения веществ. Объём и состав образуемой в почках мочи могут меняться в значительных пределах, отражая состояние водно-солевого обмена и других сторон метаболизма организма. Обследование каждого больного в стационаре и в амбулаторных условиях должно сопровождаться обязательным анализом мочи, так как это исследование может помочь в постановке диагноза, а нередко совершенно изменить первоначальные диагностические предположения, оценить эффективность проводимой терапии.

Цель

1. Изучение механизмов образования мочи, общих свойств и химического состава мочи в норме и при патологии, роли почек в поддержании водно-солевого обмена и КОС.
2. Освоение методов оценки физико-химических параметров мочи.

Вопросы для самоподготовки

1. Метаболизм почек. Отличие обмена веществ в корковом и мозговом слоях. Локализация аэробного и анаэробного окисления глюкозы, глюконеогенеза и особенности обмена белков и липидов в почках. Роль почек в синтезе биологически активных веществ (креатин, эритропоэтин, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$).
2. Роль ферментов в реализации функции почек – глицинамидинтрансфераза, Na^+/K^+ -АТФаза, глутаматдегидрогеназа, глутаминдезаминаза, щелочная фосфатаза, изоферменты лактатдегидрогеназы.
3. Потребность в чистой воде, источники воды в организме и пути её выведения. Роль кожи, легких, органов ЖКТ, почек в выведении воды. Рециркуля-

ция воды между кровью и ЖКТ, кровью и почками.

4. Факторы, влияющие на количество воды в организме – объём циркулирующей крови, осмоляльность, артериальное давление, концентрация Na^+ и K^+ .
5. Схема строения нефрона. Процессы образования мочи: фильтрация, реабсорбция и секреция. Места действия и эффект гормонов, регулирующих минеральный и водно-солевой обмена.
6. Характеристика фильтрации, факторы, влияющие на ее скорость и величину. Оценка скорости клубочковой фильтрации в клинической практике. Клиренс и вещества, используемые для его определения. Метод определения клиренса веществ по креатинину.
7. Реабсорбция, биохимические реакции в просвете канальца и в клетках проксимального и дистального отделов нефрона. Противоточно-умножительный механизм концентрирования мочи. Транспорт-максимум для глюкозы.
8. Регуляция реабсорбции воды. Роль антидиуретического гормона, стимуляция его синтеза и выделения. Метаболические последствия и клинические проявления гипофункции антидиуретического гормона.
9. Регуляция реабсорбции натрия. Активация и функционирование системы «ренин-ангиотензин-альдостерон», роль системы в реабсорбции натрия (схема). Механизм возникновения гипертензии при нарушении кровообращения в почках, причины таких нарушений.
10. Регуляция реабсорбции кальция. Роль $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, паратгормона и кальцитонина в обмене кальция.
11. Роль почек в поддержании кислотно-основного состояния – реабсорбция бикарбонатов, ацидогенез, аммонιοгенез, выделение органических кислот.
12. Общие свойства мочи здорового человека: количество, цвет, прозрачность, запах, рН, относительная плотность, поверхностное натяжение. Нормальные величины. Изменение показателей при патологии. Методы и диагностическое значение определения физико-химических свойств мочи (плотность, величина рН). Визуально оцениваемые параметры, их клиническое значение.
13. Органические и неорганические компоненты мочи здорового человека.
14. Причины появления патологических компонентов мочи: белок, глюкоза, кетоновые тела, жёлчные пигменты (билирубин, уробилиноген), кровь (гемоглобин, эритроциты), ферменты. Методы, диагностическое значение оценки патологических компонентов мочи.

Темы для реферативных сообщений

1. Физиологическая и патологическая протеинурия и креатурия.
2. Механизмы действия диуретических средств. Использование диуретиков в клинической практике.

Лабораторная работа 1 Оценка физико-химических свойств мочи

Материал для исследования

- 1) Нормальная моча, 2) образцы патологической мочи № 1, 2, 3.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНОЙ ПЛОТНОСТИ МОЧИ

Принцип

Относительная плотность (удельный вес) мочи пропорциональна концентрации растворённых в ней веществ (органических соединений и электролитов) и отражает концентрационную способность почек.

Оборудование

Урометры двух типов (со шкалой 1,000–1,030 и шкалой 1,030–1,060), высокий цилиндр.

Проведение анализа

При наличии на поверхности мочи пены её удаляют фильтровальной бумагой. Если мочи мало, то перед исследованием её можно развести в 2–3 раза дистиллированной водой, а полученный результат умножить на степень разведения.

В высокий узкий цилиндр наливают по стенке мочу и осторожно погружают в неё урометр так, чтобы он не касался стенок и дна цилиндра. Производят отсчёт по шкале урометра, используя нижний мениск жидкости.

В случае большой относительной плотности мочи берут второй тип урометра (шкала 1,030–1,060). Если моча имеет температуру, не соответствующую условиям, отмеченным на урометре, то на каждые 3 °С выше или ниже этой температуры соответственно добавляют или отнимают по 0,001 от показаний шкалы урометра.

Нормальные величины

Моча 1,008–1,026.

Клинико-диагностическое значение

У здорового человека относительная плотность мочи зависит от многих условий, но в основном от суточного диуреза – чем выше диурез, тем она ниже. У здоровых людей сумма первых двух цифр суточного диуреза и последующих двух цифр относительной плотности мочи обычно составляет 30 (например, если суточный диурез 1100 мл и относительная плотность 1019 г/л, то 11+19=30). Относительная плотность нормальной мочи прямо зависит от концентрации растворимых веществ и находится в обратной зависимости от количества выделяемой мочи. Увеличение относительной плотности мочи отмечается при сахарном диабете (глюкозурия), поражении гломерулярного фильтра (протеинурия). Снижение плотности связано с полиурией любой этиологии.

ОЦЕНКА ОКРАСКИ (ЦВЕТА) МОЧИ

Принцип

Цвет мочи зависит от содержания пигментов (урохрома, уробилина, порфирина) и тесно связан с плотностью (обусловлена концентрацией растворенных в моче веществ и реакцией), более интенсивную окраску имеет концентрированная моча и моча с кислой реакцией. Необычная окраска мочи может появиться при употреблении овощей и фруктов яркой окраски (свекла, земляника, морковь и др.), лекарств (амидопирин, рибофлавин) и иных веществ.

Проведение анализа

Окраску образца мочи оценивают визуально в процессе измерения относитель-

ной плотности, когда моча находится в длинном прозрачном цилиндре.

Нормальные величины

Моча от янтарно-жёлтого до соломенно-жёлтого.

Клинико-диагностическое значение

Повышение интенсивности окраски мочи (гиперхромурия) – при уменьшении её выделения за счёт потери жидкости при поносах, рвоте, лихорадочных состояниях. Снижение интенсивности окраски мочи (гипохромурия) – при различных видах полиурии (особенно сахарном и несахарном диабете), нефросклерозе.

Характерное изменение окраски мочи может свидетельствовать о патологии: зеленовато-бурый (цвет «пива») – механическая желтуха вследствие билирубинурии; зеленовато-жёлтый – паренхиматозная желтуха вследствие билирубинурии, уробилиногенурии; от зеленовато-жёлтого до грязно-коричневого – пиурия; цвет «мясных помоев» – гематурия и гемоглобинурия при органических заболеваниях почек (острый нефрит); красно-коричневый – метгемоглобинурия; красно-бурый – миоглобинурия и острый инфаркт миокарда; синий – индиканурия, употребление метиленовой сини; молочно-белый – липурия и хилурия при поражении канальцев почек; чёрно-бурый – алкаптонурия, меланоз, малярия; чёрный – меланинурия при меланосаркоме, гемоглобинурия при острой гемолитической почке.

ОЦЕНКА ПРОЗРАЧНОСТИ МОЧИ

Проведение анализа

Прозрачность образца мочи оценивают визуально в процессе измерения относительной плотности, когда моча находится в длинном прозрачном цилиндре.

Нормальные величины

Моча прозрачна.

Клинико-диагностическое значение

Помутнение мочи практически всегда обусловлено выпадением в осадок солей, большим количеством лейкоцитов, бактерий, эпителиальных клеток, почечных цилиндров, слизи, свидетельствуя о наличии воспалительного процесса в мочевыводящей системе.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ pH МОЧИ

Принцип

Основан на изменении цвета индикатора в соответствии со значением pH определяемого раствора.

Проведение анализа

Полоску индикаторной бумаги опускают в пробирку с мочой и по изменению цвета, сравнивая с эталонной шкалой на упаковке, устанавливают pH мочи.

Нормальные величины

Моча 5,0–6,5

Клинико-диагностическое значение

См. лабораторную работу 2 (стр. 148).

Оформление работы

Указывают принцип метода, регистрируют результаты в таблице и далее используют их для формулирования выводов в лабораторной работе 2.

Образцы мочи	Выявляемый показатель			
	Плотность	Цвет	Прозрачность	pH
Норма				
Образец №...				

Лабораторная работа 2

Экспресс-определение патологических компонентов мочи

Материал для исследования

1) Нормальная моча, 2) образцы патологической мочи № 1, 2, 3.

Оборудование

Тест-полоски «Глюкофан», «Кетофан», «Диафан», «Альбуфан», «Билифан», «Иктофан», «Пентафан».

Проведение анализа

Не прикасаясь руками к зоне индикации, из упаковки берут полоску, погружают зону индикации на 1–2 с в образец мочи. Капли удаляют, проведя полоской по краю сосуда. Полоски оставляют в горизонтальном положении. Через 1 мин по цветной шкале упаковки определяют концентрацию искомого вещества.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ ТЕСТ-ПОЛОСКАМИ «ГЛЮКОФАН»

Принцип

Принцип определения глюкозы основан на глюкозооксидазной реакции. Зона индикации пропитана растворами ферментов глюкозооксидазы, пероксидазы и красителем тетраметилбензидином. Глюкоза с помощью глюкозооксидазы окисляется кислородом воздуха до глюконовой кислоты с образованием перекиси водорода. Перекись водорода в присутствии фермента пероксидазы окисляет краситель, в результате чего жёлтая окраска переходит в зелёную.

Нормальные величины

Глюкоза	Тест-полоски «Глюкофан»	проба отрицательна
	другие методы	0,1–0,8 ммоль/л (1–15 мг/100 мл (мг%))

Клинико-диагностическое значение

Содержание глюкозы в моче возрастает при всех случаях гипергликемии свыше 10 ммоль/л (почечного порога). Глюкозурии бывают физиологическими и патологическими. К физиологическим относятся алиментарная глюкозурия, глюкозурия беременных и нейрогенная глюкозурия на почве стрессовых состояний. Патологическая глюкозурия обнаруживается при гипергликемии (сахарный диабет, тиреотоксикоз, акромегалия, гиперплазия коры надпочечников,

инфаркт миокарда, отравления морфином, фосфором, кровоизлияния во внутренние органы, острые инфекции и нервные заболевания), повреждениях почечных канальцев (пиелонефриты, гломерулонефриты, токсические поражения почек, почечный диабет (семейная почечная глюкозурия)), нефропатии.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЕТОНОВЫХ ТЕЛ ТЕСТ-ПОЛОСКАМИ «КЕТОФАН»

Принцип

Основан на реакции Легала. Жёлтая зона индикации содержит щёлочной буфер с нитропруссидом натрия, дающий с ацетоном и ацетоуксусной кислотой красное, вишнёвое или фиолетовое окрашивание. Проба более чувствительна к ацетоуксусной кислоте, чем к ацетону, с β -гидроксимасляной кислотой нет реакции. Интенсивность окраски отражает только уровень ацетоуксусной кислоты.

Нормальные величины

Кетоновые тела	тест-полоски «Кетофан»	проба отрицательна
	другие методы	20–30 мг/сут

Клинико-диагностическое значение

Кетоновые тела в моче (кетонурия) появляются при кетонемии, которая возникает при голодании, сахарном диабете, повышении концентрации жиромобилизующих гормонов в крови.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА ТЕСТ-ПОЛОСКАМИ «АЛЬБУФАН»

Принцип

Тест основан на изменении цвета с жёлтого до зелёно-голубого кислотных основных индикаторов (тетрабромфенолового синего и эфира тетрабромфенолфталеина) под влиянием белков. Проба наиболее чувствительна к альбуминам, значительно менее чувствительна к глобулинам, мукопротеинам, гемоглобину. При сильно щёлочном значении рН мочи проба может давать ложноположительные результаты.

Нормальные величины

Белок	Тест-полоски «Альбуфан»	проба отрицательна
	Другие методы	10–140 мг/л

Клинико-диагностическое значение

Небольшое количество белка в суточной моче обнаруживают и у практически здоровых лиц, однако в разовой порции мочи такие концентрации обычными методами не выявляются. Часть этих белков сывороточного происхождения, другая часть – продукт клеток мочевыводящих путей.

В зависимости от места возникновения протеинурию подразделяют на *преренальную*, которая связана с усиленным распадом белка тканей или выраженным гемолизом, *ренальную*, которая обусловлена патологией клубочков или канальцев почек, и *постренальную*, которая возникает на фоне воспаления мочевыводящих путей.

*ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИЛИРУБИНА И УРОБИЛИНОГЕНА
ТЕСТ-ПОЛОСКАМИ «ИКТОФАН»*

Принцип

Полоски содержат две зоны индикации – для билирубина и для уробилиногена. Первый тест основан на реакции сочетания билирубина со стабилизированным диазореактивом. Реакционная зона содержит пара-нитрофенилдиазониевый пара-толуолсульфонат, натриевый бикарбонат и сульфосалициловую кислоту. При контакте с конъюгированным (прямым) билирубином через 30 сек появляется сиреневато-бежевая (сиреневато-розовая) окраска, интенсивность которой зависит от концентрации определяемого билирубина.

Во втором тесте определение уробилиногена основано на реакции азосочетания уробилиногена со стабилизированной солью диазония. В присутствии уробилиногена в моче реакционная зона меняет своё окрашивание на розовое или красное.

Нормальные величины

Билирубин	проба отрицательна
Уробилиноген	до 17,0 мкмоль/л

Клинико-диагностическое значение

Появление билирубина в моче связано с возникновением механической или паренхиматозной желтухи, когда из крови в мочу фильтруется прямой билирубин. Повышение концентрации уробилиногена в моче наблюдается при паренхиматозных заболеваниях печени (гепатиты, циррозы, отравления), а также при гемолитических состояниях и кишечных заболеваниях, связанных с избыточным всасыванием стеркобилиногена слизистой оболочкой кишечника (энтероколиты, запоры).

*ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕМОГЛОБИНА И ЭРИТРОЦИТОВ
ТЕСТ-ПОЛОСКАМИ «ГЕМОФАН»*

Кровь в моче может находиться в двух видах – в виде клеток крови (гематурия, эритроцитурия) или в виде кровяного пигмента (гемоглобинурия).

Принцип

Зона индикации тест-полосок содержит органический гидропероксид (куменовая перекись водорода) и индикатор тетраметилбензидин. Гемоглобин катализирует окисление индикатора гидропероксидом с образованием окрашенных в сине-зеленый цвет продуктов. При отрицательной реакции зона индикации остается желтоватой (без зелёного оттенка). В присутствии свободного гемоглобина (гемоглобинурия или гемолиз присутствовавших первично эритроцитов) вся сенсорная зона окрашивается в достаточно однородный сине-зелёный цвет. Неизмененные (целые) эритроциты (микрогематурия) проявляются интенсивно окрашенными сине-зелёными точками или пятнышками на неокрашенной реагентной зоне или равномерной сине-зелёной окраской всей зоны (макрогематурия).

Нормальные величины

Эритроциты и гемоглобин	проба отрицательна
-------------------------	--------------------

Клинико-диагностическое значение

Единичные эритроциты обнаруживаются в моче даже абсолютно здоровых людей. У практически здоровых людей выделяется до 1 миллиона эритроцитов в сутки, что соответствует содержанию в 1 мкл мочи 1 эритроцита. Гематурия бывает при поражении паренхимы почки (гломерулонефрит, пиелонефрит, опухоли), тяжелой физической нагрузке, поражении мочевыводящих путей.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЕТОНОВЫХ ТЕЛ И ГЛЮКОЗЫ ТЕСТ-ПОЛОСКАМИ «ДИАФАН»

Принцип

Полоски содержат две зоны индикации – для кетоновых тел и для глюкозы. Принцип определения кетоновых тел такой же, как в полосках «Кетофан». Принцип определения глюкозы такой же, как в случае полосок «Глюкофан».

Нормальные величины

Глюкоза	тест-полоски «Глюкофан»	проба отрицательна
	другие методы	0,10,8 ммоль/л или 1–15 мг/100 мл (мг%)
Кетоновые тела	тест-полоски «Кетофан»	проба отрицательна
	другие методы	20–30 мг/сут

Клинико-диагностическое значение

Значение соответствует таковому у приведенных выше экспресс-тестов «Глюкофан» и «Кетофан».

ОПРЕДЕЛЕНИЕ pH, ГЛЮКОЗЫ, КЕТОНОВЫХ ТЕЛ, БЕЛКА И КРОВИ ТЕСТ-ПОЛОСКАМИ «ПЕНТАФАН»

Диагностические полоски «Пентафан» имеют 5 зон индикации для определения кетоновых тел, крови, глюкозы, белка и величины pH.

Принцип

Принцип определения pH заключается в переходе цвета смешанного кислотно-основного индикатора в диапазоне pH 5,0–9,0 от оранжевой окраски в желтую, далее в зеленую до появления синего цвета.

Принцип определения крови такой же, как полосками «Гемофан», белка – такой же, как полосками «Альбуфан», кетоновых тел – такой же, как полосками «Кетофан», глюкозы – такой же, как полосками «Глюкофан».

Нормальные величины

Белок	тест-полоски «Альбуфан»	Проба отрицательна
	Другие методы	10–140 мг/л
Кетоновые тела	тест-полоски «Кетофан»	Проба отрицательна
	другие методы	20–30 мг/сут
Глюкоза	тест-полоски «Глюкофан»	Проба отрицательна
	другие методы	0,1–0,8 ммоль/л или 1–15 мг/100 мл (мг%)
Эритроциты и Hb	взрослые	Проба отрицательна
pH		5,0–6,5

Оформление работы

Указывают принципы методов, регистрируют полученные результаты исследования образцов мочи в виде таблицы и, учитывая результаты «Лабораторной работы 1», делают общие выводы о возможной патологии.

(Для анализа мочи на патологические компоненты можно использовать другие варианты существующих экспресс-тестов, соответствующих выполнению поставленной задачи исследования).

Показатель	Вид теста	Образцы мочи			
		Норма	№ 1	№ 2	№ 3
рН	Пентафан				
Глюкоза	Глюкофан Диафан Пентафан				
Белок	Альбуфан Пентафан				
Кетоновые тела	Кетофан Диафан Пентафан				
Билирубин	Билифан Иктофан				
Уробилиноген	Иктофан				
Гемоглобин	Гемофан				
Эритроциты	Гемофан				

Лабораторная работа 3

Определение содержания креатинина в моче

Принцип

Креатинин в щелочной среде образует с пикриновой кислотой пират креатинина оранжевого цвета, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации креатинина.

Реактивы

1) 10% раствор NaOH, 2) насыщенный раствор пикриновой кислоты, 3) стандартный раствор креатинина (0,177 ммоль/л).

Материал для исследования

Моча (разведение 1:50)

Проведение анализа

	Опыт, мл	Стандарт, мл
Моча	0,5	–
Стандартный раствор креатинина	–	0,5
Дистиллированная вода	0,5	0,5
NaOH	0,5	0,5
Насыщенный раствор пикриновой кислоты	0,5	0,5
	Перемешивают, инкубируют 20 мин, измеряют оптическую плотность проб против H ₂ O, при длине волны 500–560 нм в кювете 0,5 см	

Расчёт

$$\text{Креатинин [ммоль/л]} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}} \times 50$$

где: $E_{\text{оп}}$ – оптическая плотность пробы, $E_{\text{ст}}$ – оптическая плотность стандарта, $C_{\text{ст}}$ – концентрация стандартного раствора, 50 – разведение мочи.

Нормальные величины

Сыворотка	женщины	44–88 мкмоль/л
	мужчины	44–100 мкмоль/л
Суточная моча		4,4–17,7 ммоль/сут

Клинико-диагностическое значение

Увеличение концентрации креатинина в моче: при повышенной физической активности, лихорадочных состояниях, выраженной недостаточности функции печени, сахарном и несахарном диабете, синдроме длительного раздавливания, острых инфекциях. Снижение показателя: при хроническом нефрите, мышечной атрофии, дегенерации и амилоидозе почек, лейкемии, голодании. Содержание креатинина не является чувствительным тестом в ранней стадии заболевания почек.

Оформление работы

Указывают принцип метода, регистрируют результаты анализа, сравнивают полученные данные с нормальными значениями, делают вывод о наличии патологических отклонений, отмечают практическую значимость работы.

Лабораторная работа 4

Проба Реберга: определение клиренса креатинина (теоретически)

Материал для исследования

1) Сыворотка крови, 2) моча.

Принцип

Если вещество присутствует в плазме в стабильной концентрации, физиологически инертно, свободно фильтруется в клубочках, а также не секретировается, не реабсорбируется, не синтезируется и не превращается в почках, то количество

этого вещества, профильтрованного в клубочках, равно количеству, выведенному с мочой. Образовавшийся в организме креатинин практически полностью фильтруется в почечных клубочках и не подвергается реабсорбции в почечных канальцах. Соотношение концентраций креатинина в моче и плазме крови за определенный промежуток времени позволяет судить о фильтрующей способности почек.

Проведение анализа

Обследуемый выпивает натощак 400–500 мл воды или слабого чая. Немедленно идет в туалет. После мочеиспускания отмечают точное время. Ровно через 30 мин из вены берут кровь и определяют в ней концентрацию креатинина. Через час полностью собирают мочу и определяют её общий объём, вычисляют минутный диурез, определяют концентрацию креатинина в моче (см. работу «Определение содержания креатинина в сыворотке крови и моче»).

Расчёт

$$C = \frac{U}{P} \times D,$$

где: C – показатель клиренса (мл/мин), D – минутный диурез (мл/мин),
U и P – концентрация креатинина в моче и плазме соответственно.

Нормальные величины

Скорость клубочковой фильтрации по креатинину 80–120 мл/мин

Клинико-диагностическое значение

Креатинин является единственным веществом, полностью фильтруемым почками и не подвергаемым реабсорбции, поэтому клиренс креатинина принимают за 100% и сравнивают с ним клиренс любого иного вещества.

Повышение скорости клубочковой фильтрации наблюдается при увеличении сердечного выброса, при беременности, отравлении окисью углерода, белковой диете и гиперкатаболических состояниях, анемии. Снижение показателя клиренса выявляется при шоке, кровотечении, дегидратации, сердечной недостаточности, различных патологиях почек, гипопункции коры надпочечников.

Оформление работы

Отмечают принцип метода, указывают ценность показателя и клинико-диагностическое значение анализа.

Вопросы для самоконтроля

1. Функции почек, роль коркового и мозгового вещества. Нефрон, противоточно-умножительный механизм образования мочи. Состав, параметры мочи.
2. Секреция и реабсорбция (глюкоза, натрий, вода и др.). Почечный порог.
3. Гормоны, регулирующие водно-электролитный обмен, строение и эффекты. Место и химизм синтеза альдостерона, механизм действия на клетку, роль. Система «ренин-ангиотензин-альдостерон» и антидиуретический гормон.
4. Гормоны, регулирующие минеральный обмен, их строение и эффект в организме. Место и химизм синтеза паратгормона, кальцитонина, кальцитрио-

лов, механизм действия на клетку, взаимодействие в организме.

5. Детоксикационная функция почек по утилизации и выведению аммиака и других азотистых продуктов. Остаточный азот мочи. Почки в синтезе креатина, роль креатинфосфата, клиренс креатинина и др.
6. Химизм аммионогенеза и сопряжение с ацидогенезом и реабсорбцией натрия. КОС и почки, буферные системы организма и аммиачный буфер.
7. Патологические компоненты мочи. Моча при сахарном диабете, патологии почек. Виды протеинурии. Появление билирубина, желчных кислот, крови.

Тестовые задания

Выбрать правильные ответы.

1. ПОВЫШЕНИЕ АКТИВНОСТИ АЛАТ В КРОВИ НАИБОЛЕЕ ХАРАКТЕРНО ДЛЯ ПОВРЕЖДЕНИЯ КЛЕТОК

- 1) миокарда
- 2) печени
- 3) скелетных мышц
- 4) почек
- 5) поджелудочной железы

2. АКТИВНОСТЬ КРЕАТИНКИНАЗЫ СЫВОРОТКИ КРОВИ НАИБОЛЕЕ ЗНАЧИТЕЛЬНО ПОВЫШАЕТСЯ ПРИ РАЗРУШЕНИИ

- 1) эритроцитов
- 2) гепатоцитов
- 3) кардиомиоцитов
- 4) клеток почек
- 5) клеток поджелудочной железы

3. БЕЛКАМИ ПЛАЗМЫ КРОВИ, АКТИВНО УЧАСТВУЮЩИМИ В РЕАКЦИЯХ ИММУНИТЕТА, ЯВЛЯЮТСЯ

- 1) транспортные альбумины
- 2) компоненты системы комплемента
- 3) трансферрины
- 4) церулоплазмины
- 5) фотопротеины

4. МОЛЕКУЛА ОБНАРУЖИВАЕМОЙ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ СОСТОИТ ИЗ СУБЪЕДИНИЦ ТИПА

- 1) В и М
- 2) Н и М
- 3) В, М, Н
- 4) В и Н
- 5) только В

5. ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ КОАГУЛЯЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ БЕЛКОВ КРОВИ ПОЛЕЗЕН ВОДОРАСТВОРИМЫЙ АНАЛОГ ВИТАМИНА К

- 1) викасол
- 2) филлохинон
- 3) витамин К1
- 4) менахинон
- 5) витамин К2

6. ФУНКЦИЕЙ ЛИПОПРОТЕИНОВ КРОВИ ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) транспорт нейтральных жиров к месту синтеза
- 2) транспорт липидов между органами
- 3) регуляция активности некоторых факторов свертывания крови
- 4) участие в энтерогепатической рециркуляции

7. ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ АЦИДОЗЕ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПОВЫШАЕТСЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ

- 1) кетоновых тел
- 2) глюкозы
- 3) свободных жирных кислот
- 4) мочевины

8. АЗОТСОДЕРЖАЩИМ ВЕЩЕСТВОМ, ХАРАКТЕРНЫМ ДЛЯ ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ МОЧИ, ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) мочевины
- 2) билирубин
- 3) мочевая кислота
- 4) креатинин

9. СУТОЧНАЯ ЭКСКРЕЦИЯ МОЧЕВИНЫ ПОВЫШАЕТСЯ ПРИ

- 1) нарушении функции почек
- 2) усилении катаболизма белков
- 3) нарушении функции печени
- 4) несахарном диабете

10. ПРИ ГАЗОВОМ АЦИДОЗЕ В КРОВИ ПОВЫШАЕТСЯ СОДЕРЖАНИЕ

- 1) кетоновых тел
- 2) глюкозы
- 3) свободных жирных кислот
- 4) бикарбонатов

Ситуационные задачи

Ответы подробно пояснить.

1. У больного диагностирован сахарный диабет I типа. Содержание глюкозы в плазме крови пациента, взятой натощак, оказалось равным 15 ммоль/л, гликированного гемоглобина 8,5 %.

Указать, следствием чего является гликирование гемоглобина. Пояснить, есть ли глюкоза в моче и каковы возможные причины её появления. Назвать характерные изменения биохимических показателей, выявляемые в крови и моче при сахарном диабете.

2. При неправильной эксплуатации печного отопления у людей часто происходит отравление угарным газом.

Объяснить, что происходит с гемоглобином крови при отравлении СО. Показать, как влияет структура гемоглобина на его функцию. Назвать, какие ферменты плазмы крови с четвертичной структурой имеют диагностическое значение, и пояснить, какие из их изоферментов используют в диагностике инфаркта миокарда.

**ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ, СВОЙСТВА И ФУНКЦИИ КРОВИ.
ОБМЕН ЖЕЛЕЗА. ЭРИТРОЦИТ. НЕОРГАНИЧЕСКИЕ ВЕЩЕСТВА
КРОВИ. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И СОСТАВ
НОРМАЛЬНОЙ МОЧИ. ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ КОМПОНЕНТЫ МОЧИ.
(КОНТРОЛЬ ПО ТЕМЕ 12)**

Вопросы для самоподготовки

Кровь, моча и почки

1. Понятие общего белка крови, компоненты, входящие в его состав. Физиологические функции белков крови, нормальные показатели концентрации. Причины изменения концентрации общего белка в крови.
2. Белковые фракции сыворотки крови. Характеристика альбуминов, биологическая роль, причины гипо-, гипер- и анальбуминемий. Глобулины и их фракции, основные представители фракций, биологическая роль. (Приложение 5).
3. Нормальные показатели белковых фракций, диспротеинемии и парапротеинемии. Причины изменения концентрации белковых фракций в крови. Нормальная протеинограмма. изменение соотношения белковых фракций при остром и хроническом воспалении, заболеваниях печени, почек, опухолях.
4. Характеристика небелковых азотсодержащих компонентов крови (фракции остаточного азота). Роль и метаболизм мочевины, креатина/креатинина, мочевой кислоты. Клинико-диагностическое значение определения этих веществ в крови, их нормальные показатели. Причины и последствия гипераммониемий и азотемий. Понятие клиренса.
5. Характеристика ферментов крови (плазмоспецифичные, индикаторные, экскреторные), примеры. Использование ферментов крови для диагностики заболеваний.
6. Особенности метаболизма и функций эритроцита. Роль гликолиза и пентозофосфатного пути.
7. Метаболизм железа. Пищевые источники, нормы потребления, транспорт, депонирование и мобилизация, роль трансферрина и ферритина. Клинические и лабораторные признаки недостаточности железа.
8. Строение молекулы гемоглобина. Строение гема. Нормальные и патологические формы гемоглобина. Механизм регуляции сродства гемоглобина к кислороду (2,3-дифосфоглицерат, эффект Бора и кооперативный эффект).
9. Реакции синтеза гема и гемоглобина. Регуляция процессов синтеза. Характеристика нарушений обмена гемоглобина (порфирии, талассемии, гемоглобинозы).
10. Реакции распада гема, образования билирубина и билирубинглюкуронида, локализация. Основные этапы превращения желчных пигментов в организме. Пути выведения билирубина и желчных пигментов.
11. Нарушения обмена желчных пигментов. Лабораторные критерии различных видов желтухи (надпеченочной, печеночной, подпеченочной).

12. Дыхательная функция крови. Механизмы транспорта кислорода и углекислого газа. Способы регуляции.
13. Характеристика показателей кислотно-основного состояния (КОС). Химические и физиологические механизмы регуляции кислотно-основного состояния в организме. Взаимосвязь транспорта кислорода и углекислого газа с механизмами поддержания кислотно-основного состояния.
14. Роль почек в регуляции кислотно-основного состояния: реабсорбция бикарбонатов, ацидогенез, аммионогенез.
15. Нарушения кислотно-основного состояния, его причины, изменение показателей кислотно-основного состояния. Способы компенсации при различных нарушениях КОС.
16. Характеристика биохимических процессов в нефроне. Противоточно-умножительный механизм образования мочи. Особенности реабсорбции электролитов и воды в различных отделах нефрона. Роль гормонов в процессах реабсорбции.
17. Вазопрессин (антидиуретический гормон) и минералокортикоиды: химическая природа, место синтеза, регуляция синтеза и секреции, органы-мишени, локализация рецепторов и механизм действия, влияние на обмен веществ и воды. Роль ренин-ангиотензиновой системы. Состояния, обусловленные нарушением действия гормонов. Биохимические механизмы развития почечной гипертензии.
18. Состав и физико-химические свойства мочи. Нормальные и патологические компоненты мочи, их клинко-диагностическая роль и нормальные значения.

Практическая часть

Определение параметров и компонентов крови и мочи (клинко-диагностическое значение, нормальные показатели):

- определение содержания общего белка и фракции альбуминов,
- разделение белков сыворотки крови методом электрофореза,
- определение активности α -амилазы плазмы крови и мочи,
- определение общего остаточного азота сыворотки крови,
- определение содержания гемоглобина в цельной крови,
- определение общего билирубина и его фракций в сыворотке крови,
- определения содержания хлоридов в сыворотке кров и моче,
- определение относительной плотности и рН мочи,
- экспресс-диагностика белка, глюкозы, кетоновых тел, желчных пигментов, гемоглобина в моче,
- оценка белка, глюкозы, кетоновых тел в моче,

ВОПРОСЫ ДЛЯ ИТОГОВОГО КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ

Общие вопросы

1. Предмет, задачи, основные разделы биохимии: статическая, динамическая, функциональная, клиническая. Основные методы, используемые в биохимии. Современная методология в новейших разделах биохимии (протеомике и метаболомике), клинической биохимии и лабораторной диагностике.
2. Этапы истории биохимии, заслуга отечественных и зарубежных учёных в её развитии. Значение биохимии в биологии, медицине. Крупные достижения биохимии последних лет, основные направления и перспективы развития.

Аминокислоты, белки, нуклеиновые кислоты. Азотистый обмен

3. Общее строение и особенности структуры природных аминокислот, физико-химические свойства (изомерия и стереоизомерия, электролитическая диссоциация и изоэлектрическая точка, растворимость и др.). Классификации: по физико-химическим свойствам, биологическому значению (заменимые и незаменимые), структуре боковых радикалов.
4. Протеиногенные и иные аминокислоты. Реакции посттрансляционной модификации аминокислот в белках. Роль отдельных аминокислот в организме (примеры). Аминокислоты – лекарственные препараты. Общие и специфические реакции обнаружения аминокислот.
5. Белки: определение, физико-химические свойства, форма, молекулярная масса, коллоидное состояние и факторы его стабилизации. Классификации по химическому строению, форме молекул, функциям. Определение последовательности аминокислот в белке (отщепление N-концевой аминокислоты, ферментативное и химическое расщепление по специфическим участкам, перекрывающиеся фрагменты).
6. Нативность и коллоидоустойчивость белка. Обратимое и необратимое осаждение (высаливание и др.) и денатурация белка, механизмы процессов и вызывающие их факторы (физические, химические). Реакции на белки в медицинской практике (биуретовая, с трихлоруксусной и сульфосалициловой кислотами), клинические пробы (тимоловая, Вельтмана). Методы оценки концентрации белка, разделения и очистки белков (электрофорез, хроматография и др.), значение методов.
7. Строение полипептидной цепи. Уровни пространственной организации белковой молекулы. Свойства пептидной связи, механизм и химизм её образования на рибосомах и путём нематричного синтеза. Типы связей между аминокислотами в молекуле белка (ковалентные – пептидная, дисульфидная, специфические сшивки в белках; слабые типы связей – водородные, ионные, гидрофобные), свойства и условия образования этих связей, показать на рисунке все типы связей, образуемых аминокислотами.
8. Типы вторичной структуры (α -спираль, коллагеновая спираль, β -складчатость разной направленности, нерегулярная цепь, включая образование изгибов, поворотов типа «шпилька»), разнообразие супервторичных структур. Сравнительная характеристика третичной и четвертичной струк-

тур, высшие структуры глобулярных (миоглобин и гемоглобин) и фибриллярных (коллагены, миозин) белков. Зависимость биологических свойств белка от структуры, примеры (миоглобин и гемоглобин, изменения при серповидно-клеточной анемии). Домены. Кооперативные изменения конформации. Образование активных, аллостерических центров. Самосборка молекул, фолдинг, шапероны.

9. Биологические функции белков. Типы природных лигандов (простетические группы, кофакторы, протомеры, субстраты, транспортируемые вещества, аллостерические эффекторы – активаторы и ингибиторы), их взаимодействие с белками, примеры. Механизмы избирательности взаимодействия белка с лигандом («узнавание», качественные характеристики и необходимое количество «опознавательных знаков», специфическое и слабые неспецифические взаимодействия, индуцированное соответствие и его детерминированность).
10. Виды, классификация, особенности строения и биологическая роль простых белков. Фибриллярные растворимые и нерастворимые белки. Белки плазмы крови, их функции. Белки, сопровождающие нуклеиновые кислоты (ядро клетки, сперматозоиды), характеристика типов гистонов (ключевые аминокислоты), участие в формировании нуклеосом. Белки пищевых растений.
11. Классификации сложных белков. Фосфо- и металлопротеины, гликопротеины и протеогликаны, липопротеины мембранные и транспортные, хромопротеины (ретинаяль-, флаво-, гемопротеины и их разнообразие): для каждого класса – особенности строения, химизм связи с небелковым компонентом, биологическая роль, характеристика основных представителей.
12. Разнообразие и строение нуклеотидов, связи. Свойства и функции отдельных моно- и динуклеотидов, роль в организме, примеры (АТФ, ГТФ и НАДФН, циклонуклеотиды, ФМН и ФАД, нуклеотидирование как активация субстратов – УДФГК и ФАФС, УДФ-сахара, ЦДФ-холин и др.).
13. Нуклеопротеины: типы, локализация, биологическая роль, структура белковой и небелковой частей. Классификация и строение простетических групп. ДНК и РНК: физико-химические свойства, уровни организации молекул, типы связей в молекулах (первичная структура – с формулами; остальные – схематично). Характеристика белкового компонента нуклеопротеинов, связи нуклеиновых кислот с белком.
14. Основные пищевые источники белка, нормы белка в питании, критерии полноценности пищевых белков, коэффициент изнашивания, недифференцированный азот. Азотистый баланс: типы, характеристика. Переваривание белков в желудочно-кишечном тракте, регуляция. Синтез и роль соляной кислоты, протеиназы – проферменты и пути их активации, специфичность, экзо- и эндопептидазы, пристеночное и полостное пищеварение. Переваривание сложных белков.
15. Продукты переваривания белков в желудочно-кишечном тракте, всасывание аминокислот в кишечнике, транспортёры. Пути создания и расхода метаболического фонда аминокислот крови. Механизм транспорта аминокислот в клетки. Глутатион-зависимый транспорт.
16. Гниение белка в кишечнике: реакции декарбоксилирования и образование

трупных ядов, распад серосодержащих и ароматических аминокислот (с получением газов, индола, скатола, фенола, крезола). Механизмы детоксикации в печени продуктов гниения, этапы биотрансформации токсинов – химическая модификация и конъюгация, участие ФАФС и УДФГК, получение и роль индикана.

17. Направления использования аминокислот в тканях (схема). Пути распада аминокислот (С-, N-концы, боковой радикал), основные продукты распада. Понятие о кетогенных и гликогенных аминокислотах, включение аминокислот в общие пути катаболизма, распад (АЛА, ГЛУ, АСП) до CO_2 и H_2O , энергетический выход.
18. Роль отдельных аминокислот в обмене веществ (примеры реакций). Болезни, связанные с недостатком белка в питании, патологией метаболизма отдельных аминокислот (фенилаланин и тирозин: фенилкетонурия, тирозинемия, альбинизм и др.).
19. Протеолиз как способ образования и утилизации белков в клетке, внеклеточном матриксе, плазме крови. Понятие о каскадных системах протеолиза, значение. Убиквитин, маркировка дефектных белков. Протеасомы. Протеазы лизосом. Металлопротеиназы матрикса, разнообразие и субстраты. Ингибиторы протеиназ плазмы крови и тканей.
20. Типы дезаминирования, характерные для человека (неокислительное, окислительное, трансдезаминирование), и известные в природе (восстановительное, гидролитическое, внутримолекулярное, окислительное) и используемые микрофлорой полости рта, биологическая роль. Механизм неокислительного дезаминирования, продукты. Оксидазы аминокислот, роль витамина B_2 .
21. Механизм переаминирования. Роль витамина B_6 в реакциях, катализируемых аминотрансферазами, значение глутаматдегидрогеназы и её кофактора, сопряжение с биологическим окислением (цикл Кребса). Практический смысл определения активности аланиновой и аспарагиновой аминотрансфераз в клинике, коэффициент де Ритиса.
22. Декарбоксилирование аминокислот: механизм реакции, значение ферментов и витамина B_6 . Биогенные амины, их роль в организме. Синтез гистамина, серотонина, ГАМК, дофамина (реакции). Пути инактивации биогенных аминов, аминоксидазы и витамин B_2 ; O- и N-метилтрансферазы и S-аденозилметионин (примеры реакций).
23. Основные источники аммиака в организме (схема), пути его обезвреживания (схема), причины и молекулярные механизмы токсичности. Пути утилизации аммиака: выведение из организма (синтез мочевины в печени, аммиогенез в почках) и использование для синтезов (азотистые основания, заменимые аминокислоты), в том числе синтеза транспортных форм – амидов аминокислот и аланина, аланиновый цикл. Химизм процессов утилизации, ферменты, роль в организме.
24. Понятие остаточного азота, его фракции и их соотношение в крови, моче, слюне. Нормы и клиническое значение показателей мочевины, мочевой кислоты, креатина, креатинина, клиренса креатинина. Понятие азотемии и её виды, врожденная и вторичная гипераммониемия.

25. Принципы биосинтеза и распада пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Источники азота для синтезов, продукты распада. Возможные нарушения, болезни. Метаболические и информационные взаимосвязи аминокислот и нуклеиновых кислот.
26. Генетический код, его основные положения. Структуры, участвующие в реализации генетического кода. Репликация ДНК, полуконсервативная схема репликации, модель катящихся колец, синтез ведущей и отстающей нитей, роль праймеров, ферментов, фрагменты Оказаки. Ошибки репликации, репарация повреждений. Теломераза. ПЦР-анализ.
27. Механизм и значение биосинтеза РНК (транскрипции), ферменты. Процессинг различных видов РНК, кэпирование и полиаденилирование, сплайсинг, роль малых РНК.
28. Схема биосинтеза белка (трансляция), основные фазы, ферменты, энергетика. Механизм активации аминокислот, ферменты. Роль рибосом в трансляции, аминокильный и пептидильный центры. Представление об информосоме, полисомах. Регуляция (схема Жакоба, Моно), патология синтеза белка. Понятие о молекулярных болезнях. Мутации. ИФА-исследования в клинике.

Ферменты. Витамины

29. Ферменты: определение, сходство и отличия от минеральных катализаторов, строение, понятие об апоферменте и кофакторе, их биологическом взаимодействии и роли в катализе. Функциональные центры фермента, их строение. Коферментные функции витаминов. Изоэнзимы и множественные формы фермента.
30. Специфичность действия ферментов. Регуляция активности ферментов. Активаторы и ингибиторы, механизмы действия, виды ингибирования. Компартаментализация. Механизм действия ферментов. Теории ферментативного катализа. Механизмы катализа. Зависимость скорости ферментативных реакций от различных факторов.
31. Классификация, номенклатура ферментов. Характеристика отдельных классов ферментов, характерные для них коферменты (приложение 3). Принципы определения активности ферментов, единицы измерения.
32. Локализация ферментов в клетке, маркерные ферменты. Конституциональные и индуцибельные ферменты. Значение ферментов и их ингибиторов в медицине: энзимопатии, энзимодиагностика, энзимотерапия.
33. Витамины: определение, классификация, основные функции в организме. Провитамины, витаминоподобные вещества и их отличия и сходство с витаминами, авитамины. Потребность организма в витаминах, степени обеспеченности организма витаминами, причины гипер-, гипо-, авитаминозов. Роль печени в обмене витаминов.
34. Витамин А: химическая природа (строение), провитамины, активные формы, пищевые источники, суточная потребность, гиповитаминоз, токсичность, биологическая роль.
35. Витамины группы D: строение, пищевые источники, суточная потребность, проявления недостаточности и гипервитаминоза. Провитамин D₃, синтез ак-

тивных форм, механизм действия на клетку, биологическая роль, участие в метаболизме кальция и фосфатов.

36. Витамин Е (токоферолы). Биологическая роль, особенности строения, на основе которых реализуются функции, участие в системе антиоксидантной защиты, предохранении мембран от свободно-радикальной атаки. Природные источники, суточная потребность. Гиповитаминоз.
37. Витамин К. Биологическая роль, участие в синтезе Са-связывающих глобулинов и формировании матрицы костной ткани. Природные источники, суточная потребность. Гиповитаминоз.
38. Витамин В₁, образование и строение ТДФ, его коферментные функции. Пищевые источники, суточная потребность. Симптомы гиповитаминоза, связанные с ним патологии и проявления токсичности продуктов обмена веществ.
39. Витамин В₆ (пиридоксал), биологическая роль. Строение активных форм, механизмы участия в обмене аминокислот (по группам -NH₂ и -COOH), фосфолипида. Гиповитаминоз. Пищевые источники, суточная потребность.
40. Амид никотиновой кислоты и рибофлавин: пищевые источники, суточная потребность, клиника гиповитаминозов. Строение коферментных форм (ФМН и ФАД, НАД и НАДФ), роль в реакциях метаболизма, НАД- и ФАД-зависимые ферменты в биологическом окислении, реакции синтеза НАДФ и понятие о метаболической энергии (использование восстановительной способности в реакциях синтеза и защиты).
41. Биотин и пантотеновая кислота как обязательные участники обмена жирных кислот, активные формы, механизм их действия. Биотин и VI класс ферментов. Гиповитаминозы. Источники, суточная потребность.
42. Витамины, участвующие в кроветворении (фолиевая кислота, кобаламин), понятие об активных формах, биологическая роль. Гиповитаминозы. Пищевые источники, суточная потребность.

Биологическое окисление. Общие пути катаболизма

43. Обмен веществ, взаимосвязь анаболизма и катаболизма. Схема катаболизма основных пищевых продуктов. Понятие о специфических и общих путях катаболизма. Классификация макроэргических соединений, основные представители. Пути синтеза и использования АТФ.
44. Пируват: направления участия в метаболизме, роль витаминов, ферменты. Окислительное декарбоксилирование пирувата, принципы работы и энергетика пируватдегидрогеназного комплекса.
45. Ацетил-КоА, направления участия в метаболизме. Цикл трикарбоновых кислот: алгоритм окисления ацетил-КоА, продукция CO₂ и восстановленных эквивалентов, энергетическая ценность. НАД- и ФАД-зависимые дегидрогеназы, строение восстановленных и окисленных форм коферментов, важнейшие субстраты в разных видах обмена, роль в организме, связь с дыхательной цепью митохондрий.
46. Митохондрии: строение, биологическая роль. Понятие о биологическом окислении (схема), природа окисляемого субстрата. Структура дыхательной

цепи (схема), основные звенья, механизм действия, пункты фосфорилирования, конечный акцептор. Роль убихинона, цитохромов, каталазы и пероксидаз. Электрохимический градиент и АТФ-синтаза, транспорт АДФ и АТФ. Патология энергетических процессов, разобщители транспорта электронов и синтеза АТФ.

Строение и обмен углеводов и липидов

47. Классификации, строение и биологическая роль углеводов. Природные источники. Переваривание и всасывание в желудочно-кишечном тракте, роль пектинов, клетчатки. Нарушения переваривания, патологии ферментов.
48. Катаболическая фаза обмена углеводов: анаэробный и аэробный пути распада глюкозы, гликогенолиз, их энергетическая ценность. Глюконеогенез: локализация в клетке, субстраты, ферменты и коферменты, энергетический эффект, роль митохондрий, регуляция.
49. Строение и синтез гликогена, его молекулярная патология и гликогенозы. Глюконеогенез: химизм, локализация, источники, биологическая роль. Роль печени в обмене углеводов. Принципы нейрогуморальной регуляции углеводного обмена, основные гормоны – регуляторы углеводного обмена. Характеристика сахарного диабета I и II типов.
50. Пентозофосфатный путь превращения глюкозы, биологическая роль, основные продукты. Окислительный путь образования пентоз и НАДФН (химизм), особенности использования НАДФН в эритроцитах, лейкоцитах. Представление о неокислительной стадии цикла, её роль в организме, участие ферментов, сопряжение с реакциями гликолиза.
51. Строение и классификация липидов клетки. Роль липидов в питании, переваривание и всасывание в желудочно-кишечном тракте. Синтез и роль желчных кислот. Судьба всосавшихся продуктов распада липидов. Ресинтез липидов в стенке кишечника.
52. Липопротеины. Транспортные формы липидов в крови, их характеристика и функции, значение ферментов. Участие транспортных липопротеинов в ожирении. Мобилизация жира из депо, липазы и роль гормонов, энергетика.
53. Фосфолипазы и клеточная мембрана, значение фосфолипаз A₂ и C, синтез биологически активных липидов (простагландины, лейкотриены и др.) и их роль. Витамин F: химическая природа, строение, пищевые источники, суточная потребность, роль в организме, механизм биологического действия.
54. Виды окисления жирных кислот. В-окисление, ферменты и коферменты, энергетическая ценность. Жирные кислоты и миокард, диагностика повреждений миокарда, оценка белков и ферментов.
55. Строение мультиферментного комплекса синтетазы жирных кислот, механизм синтеза. Обмен глицерола. Синтез нейтрального жира и фосфолипидов. Липотропные вещества.
56. Кетоновые тела: синтез, строение, утилизация, энергетическая ценность. Значение кетоновых тел для головного мозга и других тканей. Кетонемия, кетонурия. Заболевания и состояния, связанные с накоплением кетоновых тел в крови.

57. Холестерол: строение, роль, синтез, направления использования и пути выведения. Транспортные формы, поступление в ткани, роль фермента ЛХАТ, нарушения транспорта. Атеросклероз. Индекс, коэффициент атерогенности.

Системы регуляции и взаимосвязь обменов. Гормоны и мембраны

58. Организация систем регуляции в организме, уровни эндокринной системы и иерархические взаимосвязи, механизмы взаимодействия гормонов. Понятие о тканевых гормонах.

59. Разнообразие, состав, структурно-функциональная организация мембран клетки. Типы рецепторов клеточной мембраны, механизмы взаимодействия с лигандами, трансдукция сигнала. Роль G-белков, ионных каналов, рецепторы-ферменты (примеры). Вторичные посредники, их разнообразие, пути и реакции синтеза, взаимодействие при передаче сигнала в клетку.

60. Механизмы взаимодействия гормонов с клеткой. Мембранная и внутриклеточная рецепция гормонов, роль вторичных мессенджеров (циклических нуклеотидов, монооксида азота, кальция, диацилглицерола, инозитолтрифосфата) в переводе внешнего сигнала внутрь клетки. Внутриклеточная рецепция тиреоидных и стероидных гормонов.

61. Механизмы переноса веществ через мембраны: диффузия, активный транспорт (Na^+ , K^+ -АТФаза, Ca^{2+} -АТФаза, H^+ -АТФаза), эндо- и фагоцитоз. Роль H^+ -АТФазы в создании кислой среды желудка и лизосом, ферменты лизосом в утилизации поступающих молекул, лизосомные болезни накопления. Роль повреждения мембран в гибели клетки и развитии патологии.

62. Значение синапса в разнообразии рецепторного аппарата клетки. Строение и функционирование синапса, роль ионов Ca^{2+} , ферментов, постсинаптическая мембрана, рецепторы. Регуляция нервной и нервно-мышечной передачи.

63. Виды медиаторов, их синтез и инактивация, роль. Аминокислоты – медиаторы, обмен аминокислот (тирозина, глутамата, триптофана и др.), участвующих в образовании медиаторов.

64. Гормоны: классификации, роль в организме. Гормоны гипоталамуса. Химическая природа, разнообразие. Роль в нейрогуморальной регуляции, поддержании гормонального гомеостаза организма. Нейрогормоны. Нейропептиды, синтез и рецепция, роль в нервной ткани и организме.

65. Гормоны аденогипофиза и задней доли. Химическая природа, принципы синтеза, регуляция, механизм действия на клетки-мишени. Патологии.

66. Строение и синтез гормонов щитовидной железы, регуляция образования, рецепция, биологическое значение, гипер- и гипofункция. Роль тиреокальцитонина при патологии обмена кальция и фосфатов.

67. Химическая природа, строение и механизм действия гормонов паращитовидных желёз. Значение паратгормона в поддержании концентрации ионизированного кальция и фосфатов в крови, взаимодействие с другими гормонами и метаболитами витамина D, гипер- и гипofункция паратгормона.

68. Гормоны поджелудочной железы. Химическая природа, механизм действия на клетку. Участие в регуляции пищеварения и механизмах формирования сахарного диабета.
69. Классификация гормонов надпочечников, химическая природа. Катехоламины: строение, рецепция в клетках-мишенях, химизм синтеза и инактивации, медиаторный и гормональный эффекты, обеспечение катаболических эффектов. Роль в стресс-реакции. Патология.
70. Минералокортикоиды, глюкокортикоиды: строение, принципы синтеза, регуляция, рецепция в клетках-мишенях, механизмы биологического действия. Роль в механизмах воспаления, стресс-реакции.
71. Женские половые гормоны (эстрогены и гестагены): химическая природа, места и принципы синтеза, роль ароматазы, регуляция образования, рецепция в клетках-мишенях, влияние на обмен веществ. Патология. Понятие о регуляторных веществах плаценты.
72. Андрогены: химическая природа, места и принципы синтеза, рецепция в клетках-мишенях, биологическая роль, участие в регуляции обмена веществ. Патология. Анаболики в медицине и спорте.
73. Связь углеводного обмена с другими видами обменов. Роль печени в обмене углеводов, липидов, белков.
74. Связь липидного обмена с другими видами обменов. Кетогенез и пути его нарушения при сахарном диабете.
75. Связь азотистого обмена с другими видами обменов, механизмы влияния азотистого обмена на другие виды обменов. Роль витаминов. Глюкогенные и кетогенные аминокислоты.

Биохимия крови, печени, почек и мочи

76. Химический состав крови. Неорганические и органические компоненты (азотосодержащие и безазотистые). Белки плазмы крови, фракции электрофореза белков. Характеристика альбуминов и глобулиновых фракций, белки острой фазы. Ферменты. Значение белков и ферментов крови в диагностике заболеваний. Роль витамина К в синтезе белков свертывающей системы, признаки недостаточности.
77. Кислотно-основное состояние (КОС). Основные показатели: рН, рСО₂, рО₂ и другие. Буферные системы крови. Участие эритроцитов, легких, почек в поддержании КОС. Виды нарушений КОС.
78. Синтез гема: локализация, предшественники. Железо, влияние его метаболизма на синтез гема. Гемопротейны (гемоглобин, миоглобин, цитохромы, каталаза), представление о строении, функции. Гемоглобины, нормальные и патологические варианты их белковой части.
79. Распад гемоглобина и гема, билирубин и билирубинглюкуронид, роль печени и почек в образовании и выделении желчных пигментов из организма. Значение определения желчных пигментов в диагностике болезней печени, желчных путей, крови.
80. Патологии синтеза и распада гемоглобина. Виды желтухи, биохимическая диагностика. Талассемии. Гемоглобинозы.

81. Роль печени и почек в обмене азотосодержащих соединений, выведении азотистых продуктов обмена. Примеры детоксикации продуктов гниения белков (крезол, скатол, индол) и токсичных продуктов обмена организма.
82. Макроэлементы и микроэлементы, их биологическая роль, участие в минеральном обмене. Направления участия гормонов в минеральном обмене.
83. Водно-электролитный обмен. Роль воды, пути поступления и выведения из организма, реакции синтеза. Регуляция и патологии, связанные с водно-электролитным обменом.
84. Общие свойства, составные части мочи в норме. Механизмы регуляции и этапы образования мочи. Понятие клиренса. Роль почек в поддержании кислотно-основного состояния (ацидогенез, аммионогенез), кальцийфосфорного обмена. Патологические компоненты мочи, определение и диагностическое значение.

СПИСОК ПРИЛОЖЕНИЙ

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

ТАБЛИЦА ПРОТЕИНОГЕННЫХ АМИНОКИСЛОТ

Названия: эмпирическое, химическое, буквенные коды русско-, англоязычные)	Химическая формула Ниже заменимая (З) или незаменимая (НЗ)	Физико-химические свойства: заряд, значение ИЭГ, полярность и т.д.	Биологическая роль	Реакции посттрансляционной модификации или активная форма (если есть)	Биохимические функции (химизм участия в реакциях метаболизма)
1	2	3	4	5	6

Примечание: 1) заполнить графы 1–4 по материалу Темы 1; 2) далее, по мере изучения биологической химии, заполнять графы 5–6 и дополнять графу 4.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

ТАБЛИЦА ВИТАМИНОВ

Название витамина (буквенное, химическое, по физиологической роли)	Химическая формула, выделить активный центр).	Суточная доза	Пищевые источники	Провитамины (с образованием витамина). Антибиотики (если есть)	Активная форма витамина (кофермент или другие виды)	Биологическая роль	Участие в реакциях обмена веществ	Признаки гипо- и авитаминоза, гипервитаминоза (если есть)
1	2	3	4	5	6	7	8	9

Примечание: 1) заполнить графы 1–7 и 9, представив информацию Темы 4 по витаминам и витаминоподобным веществам; 2) далее, по мере изучения биологической химии, заполнять оставшуюся графу 8 и дополнять графу 7.

1.15. $O_2^{\cdot -}$ в качестве акцептора.

На *подподклассы* делят в зависимости от акцептора – НАД⁺ / НАДФ⁺ (1.1.1., 1.2.1., 1.3.1., 1.4.1.), дисульфиды (1.2.4.), кислород (1.3.3.).

Наиболее распространенные *рабочие названия* оксидоредуктаз:

1. **Дегидрогеназы** – оксидоредуктазы, катализируют дегидрирование субстрата, когда акцептор водорода – любая молекула, кроме кислорода.

2. **Редуктазы** – оксидоредуктазы, для которых перенос водорода от молекулы донора трудно доказуем.

3. **Оксидазы** – оксидоредуктазы, катализируют окисление субстратов с молекулярным кислородом в качестве акцептора электронов без включения кислорода в молекулу субстрата.

4. **Моноксигеназы** – оксидоредуктазы, катализируют внедрение 1 атома кислорода в молекулу субстрата с молекулярным кислородом в качестве донора.

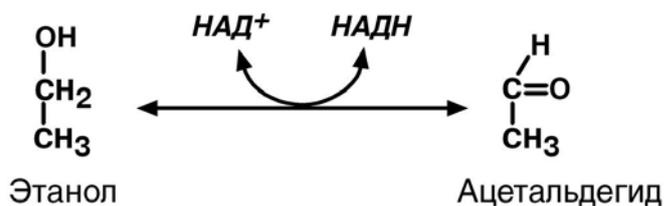
5. **Диоксигеназы** – оксидоредуктазы, катализируют внедрение 2 атомов кислорода в молекулу субстрата с молекулярным кислородом в качестве донора.

6. **Пероксидазы** – оксидоредуктазы, катализируют реакции с пероксидом водорода в качестве акцептора электронов.

Систематическое название оксидоредуктаз образуется так:

донор электронов : акцептор электронов – оксидоредуктаза.

Пример 1



Систематическое название

Алкоголь:НАД-оксидоредуктаза

Рабочее название

Алкогольдегидрогеназа

Класс

1. Оксидоредуктазы

Подкласс

1.1. Действующие на СН-ОН-группу доноров

Подподкласс

1.1.1. НАД⁺ / НАДФ⁺ в качестве акцептора

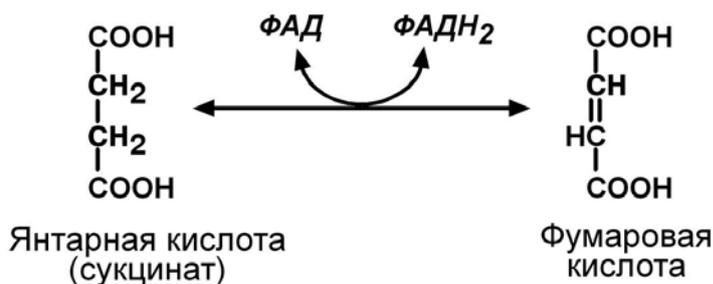
Классификационный номер

КФ 1.1.1.1.

Кофакторы

Никотинамададениндинуклеотид, Fe или Zn

Пример 2

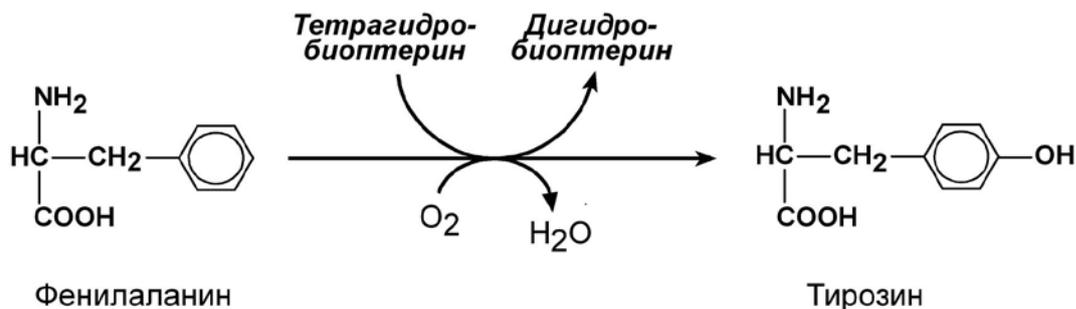


Систематическое название

Сукцинат: ФАД-оксидоредуктаза

Рабочее название	Сукцинатдегидрогеназа
Класс	1. Оксидоредуктазы
Подкласс	1.3. действующие на СН-СН-группу доноров
Подподкласс	1.3.99. с ФАД в качестве акцептора
Классификационный номер	КФ 1.3.99.1.
Кофактор	Флавинадениндинуклеотид

Пример 3



Систематическое название	Фенилаланин. Тетрагидробиоптерин: кислород-оксидоредуктаза
Рабочее название	Фенилаланин-4-монооксигеназа
Класс	1. Оксидоредуктазы
Подкласс	1.14. Два донора с включением молекулярного кислорода
Подподкласс	1.14.16. С восстановленным птеридином в качестве донора и включением 1 атома кислорода
Классификационный номер	1.14.16.1
Кофакторы	Тетрагидробиоптерин. Железо.

II класс. Трансферазы

Катализируют реакции переноса различных групп от одного субстрата (донор) к другому (акцептор), участвуют в реакциях взаимопревращений различных веществ, обезвреживания природных и чужеродных соединений. Коферменты: пиридоксальфосфат, коэнзим А, ТГФК, метилкобаламин. В *классе* 9 подклассов – в зависимости от строения переносимых групп, на *подклассы* ферменты делят в зависимости от вида переносимой группы:

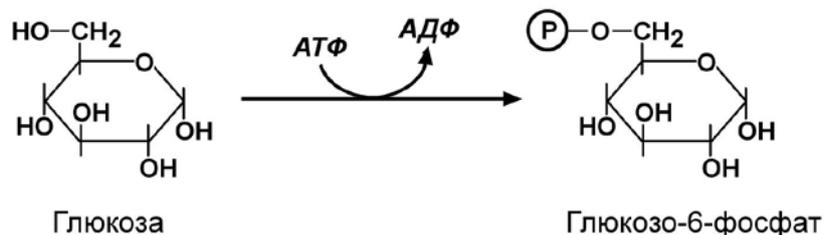
- 2.1. переносящие одноуглеродные фрагменты;
- 2.2. переносящие альдегидные и кетогруппы;
- 2.3. переносящие ацильные группы;
- 2.4. переносящие гликозильные группы;
- 2.6. переносящие азотсодержащие группы;
- 2.7. переносящие фосфорсодержащие группы;
- 2.8. переносящие сульфосодержащие группы;
- 2.9. переносящие селенсодержащие группы.

На *подподклассы* делят в зависимости от природы переносимой группы. Например: подподкласс 2.1.1. – метил; подподкласс 2.1.2. – карбоксиметил или формил; подподкласс 2.6.1. – амино-, амидино-, оксиаминогруппы.

Систематическое название трансфераз образуется так:

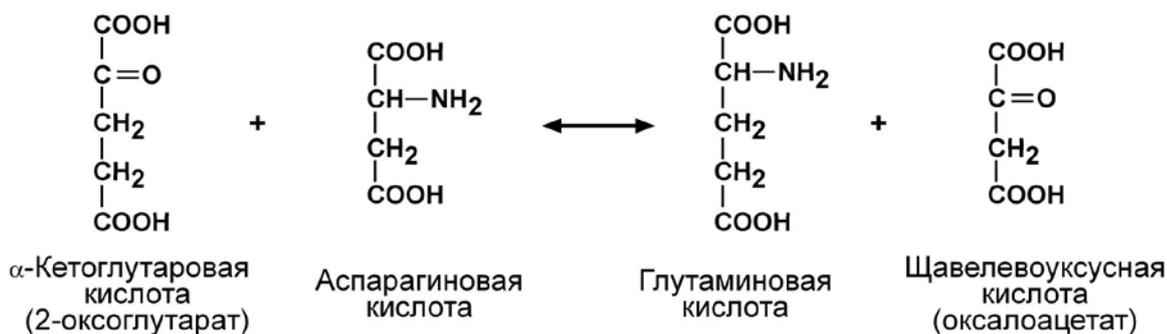
Донор группы : акцептор группы – переносимая группа трансфераза.

Пример 1



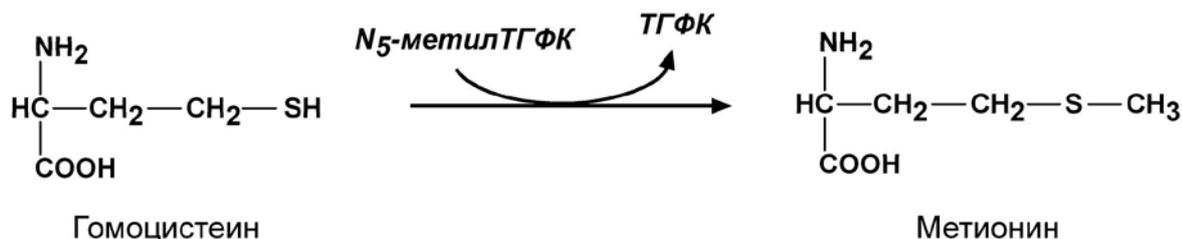
Систематическое название	АТФ:D-гексоза-6-фосфотрансфераза
Рабочее название	Гексокиназа
Класс	2. Трансферазы
Подкласс	2.7.Переносящие фосфорсодержащие группы
Подподкласс	2.7.1. Спиртовая группа в качестве акцептора
Классификационный номер	КФ 2.7.1.1.
Кофактор	Магний

Пример 2



Систематическое название	L-Аспартат:2-оксоглутарат-аминотрансфераза
Рабочее название	Аспартатаминотрансфераза
Класс	2. Трансферазы
Подкласс	2.6. Переносящие азотсодержащие группы
Подподкласс	2.6.1. Аминотрансферазы
Классификационный номер	КФ 2.6.1.1.
Кофермент	Пиридоксальфосфат

Пример 3



Систематическое название	5-метилтетрагидрофолат:L-гомоцистеин
--------------------------	--------------------------------------

Рабочее название	S-метилтрансфераза
Класс	Метионинсинтаза
Подкласс	2. Трансферазы
Подподкласс	2.1. Переносящие одноуглеродные фрагменты
Классификационный номер	2.1.1. Метилтрансферазы
Кофактор	2.1.1.13.
	Кобаламин. Цинк.

III класс. Гидролазы

Гидролазы — осуществляют разрыв внутримолекулярных связей в субстрате (за исключением С-С связей) путем присоединения элементов H₂O. Гидролазы подразделяют на 13 подклассов. Коферменты у всех гидролаз отсутствуют.

Ввиду сложности многих субстратов у ряда ферментов сохранены тривиальные названия: пепсин, трипсин, эластаза. Гидролазы сосредоточены в основном в желудочно-кишечном тракте и в лизосомах клеток тканей. Осуществляют распад макромолекул, образуя легко адсорбируемые мономеры. В основные *подклассы* гидролаз выделяют группы ферментов, катализирующих гидролиз:

- 3.1. сложных эфиров;
- 3.2. O-гликозидов;
- 3.3. простых эфиров;
- 3.4. пептидов;
- 3.5. непептидных азот-углеродных связей;
- 3.6. ангидридов кислот;
- 3.7. углерод-углеродных связей.

Среди *подподклассов* выделяют, например, гидролазы карбоновых кислот (3.1.1.), гидролазы фосфомоноэфиров (3.1.3.).

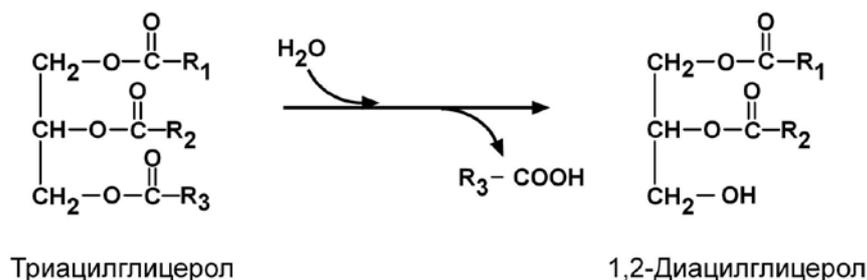
Наиболее часто встречаются следующие гидролазы:

1. **Эстеразы** – гидролиз сложноэфирных связей.
2. **Липазы** – гидролиз нейтральных жиров.
3. **Фосфатазы** – гидролиз моноэфиров фосфорной кислоты.
4. **Гликозидазы** – гидролизуют O- и S-гликозидные связи.
5. **Протеазы, пептидазы** – гидролиз белков и пептидов.
6. **Нуклеазы** – гидролиз нуклеиновых кислот.

Систематическое название гидролаз образуется следующим образом:

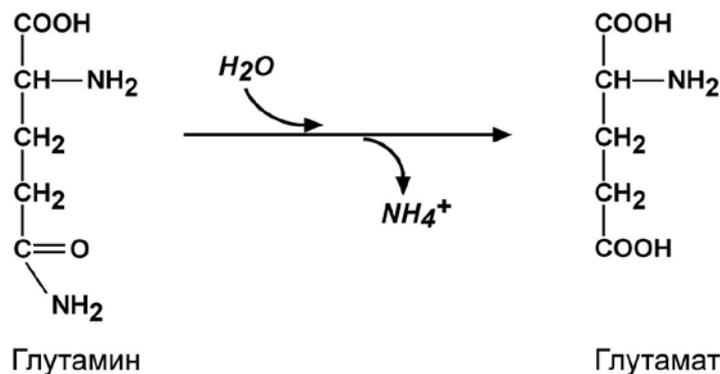
Гидролизуемый субстрат : отделяемая группа – гидролаза.

Пример 1



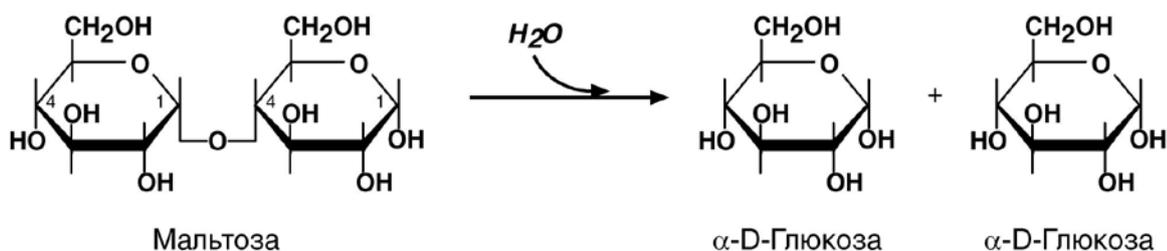
Систематическое название	Триацилглицерол:ацилгидролаза
Рабочее название	ТАГ-липаза
Класс	3. Гидролазы
Подкласс	3.1. Действующие на сложные эфиры
Подподкласс	3.1.1. Гидролазы карбоновых кислот
Классификационный номер	КФ 3.1.1.3.

Пример 2



Систематическое название	L-глутамин:амидгидролаза
Рабочее название	Глутаминаза
Класс	3. Гидролазы
Подкласс	3.5. Действующие на связи углерод-азот (непептидные)
Подподкласс	3.5.1. Действующие в линейных амидах
Классификационный номер	КФ 3.5.1.2.

Пример 3

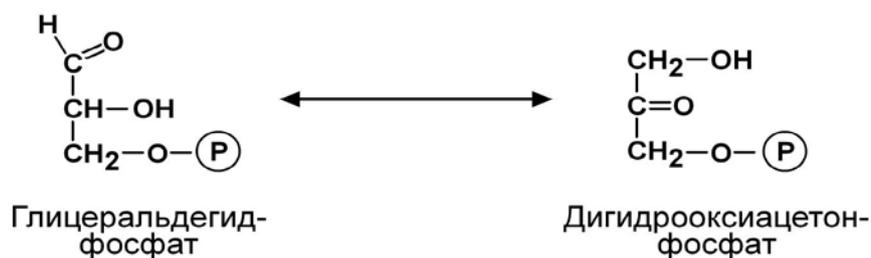


Систематическое название	α-D-глюкозид:глюкогидролаза
Рабочее название	Мальтаза
Класс	3. Гидролазы
Подкласс	3.2. Гликозидазы
Подподкласс	3.2.1. Гидролизующие O-гликозидные связи
Классификационный номер	КФ 3.2.1.20.

IV класс. Лиазы

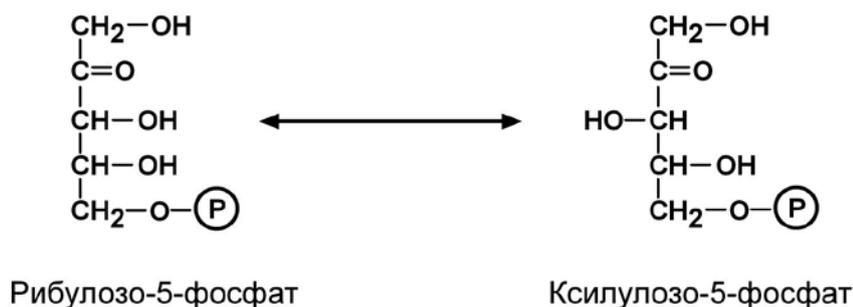
Лиазы — катализируют разрыв C–O, C–C, C–N и других связей, а также обратимые реакции отщепления различных групп субстратов по негидролитическому пути. Класс насчитывает около 230 ферментов. Выделяют 7 подклассов. Ре-

Пример 1



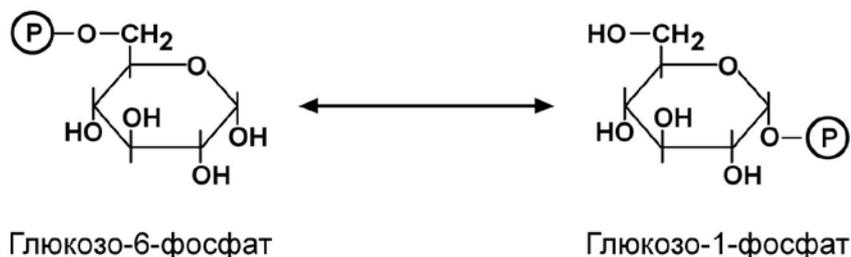
Систематическое название	D-глицеральдегид-3-фосфат-альдозо-кетозо-изомераза
Рабочее название	Триозофосфат-изомераза
Класс	5. Изомеразы
Подкласс	5.3. Внутримолекулярные оксидоредуктазы
Подподкласс	5.3.1. Взаимопревращения альдоз и кетоз
Классификационный номер	КФ 5.3.1.1.

Пример 2



Систематическое название	D-рибулозо-5-фосфат-3-эпимераза
Рабочее название	Рибулозофосфат-3-эпимераза
Класс	5. Изомеразы
Подкласс	5.1. Рацемазы и эпимеразы
Подподкласс	5.1.3. Действие на углеводы, их производные
Классификационный номер	5.1.3.1.

Пример 3



Систематическое название	α -D-Глюкозо-1,6-фосфомутаза
Рабочее название	Фосфоглюкомутаза
Класс	5. Изомеразы

Подкласс	5.4. Внутримолекулярные трансферазы
Подподкласс	5.4.2. Фосфотрансферазы
Классификационный номер	КФ 5.4.2.2.
Кофермент	Глюкозо-1,6-дифосфат

VI класс. Лигазы

Лигазы (синтетазы) – ферменты, катализирующие присоединение друг к другу двух молекул с использованием энергии высокоэнергетических связей АТФ (или других макроэргов). Лигазы – сложные ферменты, содержат нуклеотидные, биотиновые, фолиевые коферменты.

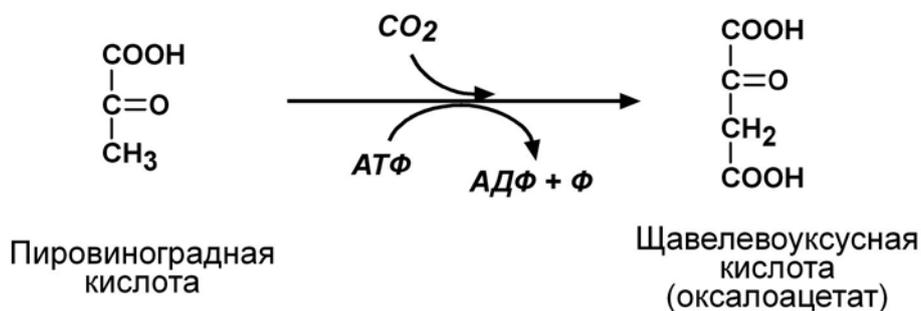
Выделяют 6 **подклассов** ферментов, формирующих связи:

- 6.1. Углерод-кислород.
- 6.2. Углерод-сера.
- 6.3. Углерод-азот.
- 6.4. Углерод-углерод.
- 6.5. Фосфор-кислород.
- 6.6. Азот-металл.

Среди **подподклассов** выделяют, например: образующие связи аминоксил-тРНК (6.1.1.), синтезирующие соединения кислота-тиол (6.2.1.), амиды (6.3.1.).

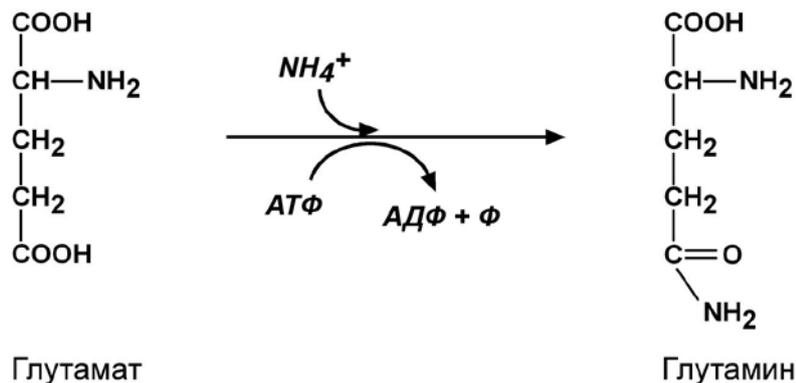
Систематическое название: Субстрат 1 : субстрат 2 – лигаза.

Пример 1



Систематическое название	Пируват: карбоксилигаза (АДФ-образующая)
Рабочее название	Пируваткарбоксилаза
Класс	6. Лигазы
Подкласс	6.4. Образующие связи углерод-углерод
Подподкласс	6.4.1. Образующие связи углерод-углерод
Классификационный номер	КФ 6.4.1.1.
Кофакторы	Биотин. Магний. Цинк.

Пример 2



Систематическое название	L-глутамат : аммиак-лигаза
Рабочее название	Глутаминсинтетаза
Класс	6. Лигазы
Подкласс	6.3. Образующие связи углерод-азот
Подподкласс	6.3.1. Амид-синтетазы
Классификационный номер	КФ 6.3.1.2.

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

ТАБЛИЦА ГОРМОНОВ

Название и химическая природа (для производных аминокислот и холестерина – формулы)	Место синтеза	Место в иерархии гормонов: регуляция синтеза и секреции гормона, регуляция действия других гормонов	Органы-мишени	Локализация рецепторов, механизм действия	Влияние на обмен веществ (углеводный, белковый, липидный, минеральный, водный) и функции организма	Гипо- и гиперфункция
1	2	3	4	5	6	7

Примечание. Заполнить таблицу по материалу темы 11, представив информацию по основным гормонам гипоталамуса, гипофиза, поджелудочной, щитовидной и паращитовидных желёз, надпочечников и половых желёз.

ПРИЛОЖЕНИЕ 5
ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ БЕЛКИ ПЛАЗМЫ КРОВИ

Фракции белков	Основные представители белковых фракций	Белки острой фазы
Альбумины	Пре- и постальбумины. Альбумин	
	α_1 -Липопротеин α_1 -Кислый серомукоид α_1 -Гликопротеин Транскортин Протромбин Антиплазмин α_1 -Антитрипсин Витамин В ₁₂ -связывающий белок	α_1 -Гликопротеин α_1 -Антитрипсин
	С-реактивный белок Гаптоглобин (Нр-1, Нр-1-2, Нр-2-2) Церулоплазмин α_2 -Липопротеин α_2 -НС-гликопротеин α_2 -Макроглобулин Холинэстераза Щелочная фосфатаза Проакцелерин Фактор Кристмаса	С-реактивный белок α_2 -Макроглобулин Гаптоглобин Церулоплазмин
Глобулины	β_1 А-глобулин β -Липопротеин β_1 В-глобулин Трансферрин Плазминоген Проконвертин Фибриноген Компоненты компле- мента С1-С4, С9 Гемопексин	Трансферрин Компоненты ком- плементарного С1-С4, С9
	Г-иммуноглобулин А-иммуноглобулин D-иммуноглобулин Е-иммуноглобулин М-иммуноглобулин	

Характеристика некоторых белков плазмы крови

Фибриноген

Фибриноген синтезируется в печени. Является белком свертывания крови.

Нормальные величины

Сыворотка 2,0–4,0 г/л

Клинико-диагностическое значение

Повышение концентрации вызывают острые воспалительные процессы и сердечно-сосудистые заболевания (атеросклероз). Снижение – гиперфибринолиз (ДВС-синдром) или наследственная недостаточность.

α_1 -глобулины

Кислый α_1 -гликопротеин

Кислый α_1 -гликопротеин (орозомукоид) обладает кислыми свойствами и содержит много углеводов, имеет высокое сродство к полианионам (например, к гепарину) и, вероятно, регулирует количество свободного гепарина в плазме. α_1 -Гликопротеин связывает лекарства (например, пропранолол, лидокаин), стероиды (прогестерон, тестостерон). Синтезируется в печени.

Нормальные величины

Сыворотка 0,55–1,40 г/л

Клинико-диагностическое значение

Повышение уровня белка в крови отмечается при острых и хронических воспалительных процессах, ревматоидном артрите, злокачественных опухолях, лихорадочных состояниях, травмах, инфаркте миокарда, физической нагрузке, беременности, нефротическом синдроме.

α_1 -Антитрипсин

α_1 -Антитрипсин - гликопротеин, образуется в печени, белок острой фазы, является ингибитором протеиназ (трипсина, химотрипсина, калликреина, плазмина) и обуславливает 92–94% от общей антипротеолитической функции крови. Аутосомно-рецессивно наследуемый недостаток его в крови является одним из факторов патогенеза эмфиземы легких, бронхоэктазий и хронического бронхита, ранних циррозов печени. Очевидно, что отсутствие ингибитора приводит к неограниченному протеолизу клеток в зоне воспаления, что удлиняет и углубляет деструктивные процессы в тканях.

Нормальные величины

Сыворотка 2,0–2,4 г/л

Клинико-диагностическое значение

Концентрация в крови возрастает при острых инфекциях, воспалительных процессах, злокачественных образованиях, действии гормонов (беременность, стероидная терапия), системной красной волчанке и злокачественных новообразованиях.

α_1 -Антихимотрипсин

α_1 -Антихимотрипсин является одним из реагирующих первыми белков острой фазы (уровень в сыворотке может удваиваться в течение нескольких часов),

выступает слабым специфическим ингибитором химотрипсина, вместе с тем отмечена его активность по отношению и к другим протеазам.

Нормальные величины

Сыворотка 0,3–0,6 г/л

Клинико-диагностическое значение

Увеличение концентрации белка обусловлено острофазовыми реакциями: воспаление, травма после хирургической операции, инфаркт миокарда, бактериальные инфекции.

α_2 -глобулины

С-реактивный белок

С-реактивный белок (СРБ) по происхождению является мезенхимальным белком, который подвергся частичной денатурации вследствие распада тканей при воспалительных и деструктивных процессах. Он участвует в активации классического пути комплемента, иммунных реакций, является ингибитором агрегации тромбоцитов, связывает липиды, углеводы, участвует в работе каталазы.

Нормальные величины

Сыворотка < 50 мг/л (отсутствие)

Клинико-диагностическое значение

Концентрация этого белка острой фазы быстро повышается в 15–25 раз при острых и хронических инфекциях, некрозе клеток, инфаркте миокарда, ревматоидном артрите, подагре.

Гаптоглобин

Гаптоглобин – белок острой фазы, синтезируется в печени. Обладает следующими функциями: связывает свободный гемоглобин плазмы и предохраняет организм от потери железа, данный комплекс разрушается в клетках ретикулоэндотелиальной системы и печени; выполняет неспецифическую защитную функцию, комплексируясь с белковыми и небелковыми веществами, появляющимися при распаде клеток; является естественным ингибитором катепсина В; участвует в транспорте витамина В₁₂. Гаптоглобин в низких концентрациях присутствует во многих жидкостях организма: ликворе, лимфе, синовиальной жидкости, желчи.

Нормальные величины

Сыворотка крови 0,8–2,7 г/л

Клинико-диагностическое значение

Концентрация белка неспецифически повышается в ответ на повреждение ткани, воспаление, опухолевый процесс (особенно с метастазами). Высокие показатели наблюдаются при сахарном диабете, нефротическом синдроме, пиелонефрите, ожогах, острых и хронических воспалительных состояниях, некрозе тканей, инфаркте миокарда, активных аутоиммунных заболеваниях, системных ревматоидных заболеваниях.

Снижение количества белка отмечено при поражении паренхимы печени, гемолитических анемиях. Уровень гаптоглобина считается чувствительным показателем гемолитических состояний: высвобождение гемоглобина вызывает снижение концентрации гаптоглобина.

α_2 -Макроглобулин

α_2 -Макроглобулин — высокомолекулярный цинксодержащий белок, состоит из 4 идентичных субъединиц и включает углеводный компонент, синтезируется в печени. Является ингибитором протеиназ (как свертывающей системы крови, так и других) — плазмина, пепсина, трипсина, химотрипсина, эндопептидаз, катепсина D, тромбина, калликреина.

Транспортирует ферменты и гормоны, рецептор лимфоцитов, участвует во взаимодействии матери и плода, оказывает иммуномодулирующее действие, ингибитор компоненты комплемента.

Нормальные величины

Сыворотка крови	мужчины	1,50–3,50 г/л
	женщины	1,75–4,20 г/л

Клинико-диагностическое значение

Белок контролирует развитие инфекций и воспалительных процессов. Повышение его уровня выявляется при циррозе печени, остром и хроническом гепатите, беременности, врожденных пороках сердца, эндокринных заболеваниях (сахарный диабет, микседема), бронхопневмонии, нефротическом синдроме.

Снижение — при ревматическом полиартрите, потере белка или недостаточности его в питании, диссеминированном свертывании крови, фибринолитической терапии, остром панкреатите, инфаркте миокарда, язвах желудка и двенадцатиперстной кишки.

Церулоплазмин

Церулоплазмин содержит 8 атомов меди. Это белок острой фазы, регулятор обмена меди в организме (комплексирует 90% всей меди плазмы) — транспортирует ионы меди из печени в другие органы.

Церулоплазмин является оксидазой полифенолов и диаминов, способствует насыщению железом апотрансферрина, участвует в обмене биогенных аминов (адреналина, норадреналина, серотонина) и аскорбиновой кислоты, регулирует уровень симпатических медиаторов мозга; выступая как сывороточный антиоксидант, ликвидирует супероксидные радикалы кислорода, восстанавливает O_2 до воды и предотвращает окисление ненасыщенных жирных кислот.

Нормальные величины

Сыворотка	0,15–0,50 г/л
-----------	---------------

Клинико-диагностическое значение

Повышенные результаты определяются при ревматоидном артрите, системной красной волчанке, хронических воспалительных процессах, холестазах, гепатите, циррозе печени, инфаркте миокарда, острых инфекциях, злокачественных новообразованиях с метастазами, при меланоме, шизофрении.

Уменьшение показателя выявлено при снижении синтеза данного белка-фермента (болезнь Вильсона-Коновалова), повышенной потере белков (заболевания желудочно-кишечного тракта, нефротический синдром), уменьшении абсорбции аминокислот в кишечнике (нарушения всасывания, недостаточность питания).

β-глобулины

Семейство трансферринов

К белкам семейства трансферринов принадлежит собственно белок под названием трансферрин, также овотрансферрин, лактоферрин, меланотрансферрин и ряд других.

Белки семейства, связывая ионы железа (III) и препятствуя их восстановлению, представляют собой важный компонент антиоксидантной защиты организма. Связывание железа трансферринами препятствует его использованию микроорганизмами, что обуславливает бактериостатическую активность этих белков.

Трансферрин

Трансферрин синтезируется в печени и ретикулоэндотелиальной системе. Трансферрин транспортирует трехвалентное железо вместе с анионом гидрокарбоната из двенадцатиперстной кишки и селезенки ко всем тканям.

В норме железом насыщено только 1/3 общего количества трансферрина.

Нормальные величины

Сыворотка крови	мужчины	2,1–3,6 г/л
	женщины	2,5–3,8 г/л

Клинико-диагностическое значение

Концентрация повышается при недостатке железа в организме, беременности, приеме эстрогенов, липоидном нефрозе.

Снижение наблюдается при наследственной недостаточности синтеза, приеме тестостерона, нефрозах, малярии, гемохроматозе, недоедании, опухолях.

Лактоферрин

Белок широко представлен в плазме крови, секреторных жидкостях: молоко, слюна, слеза, желчь, секреты носовых и бронхиальных желёз. Главной функцией лактоферрина является связывание и транспорт ионов железа, также белок обладает антибактериальной, противовирусной и антигрибковой активностью.

Нормальные величины

Сыворотка крови	0,2–0,6 мг/л
Женское молоко	до 7,0 г/л

Клинико-диагностическое значение

Увеличение содержания белка в крови отмечается при беременности, гестозах, кожных заболеваниях, злокачественных новообразованиях ЖКТ.

ПРИЛОЖЕНИЕ 6

**НОРМАЛЬНЫЕ (РЕФЕРЕНТНЫЕ) ВЕЛИЧИНЫ
ИЗУЧЕННЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ**

Сыворотка крови

Показатель	Пол, возраст, другое	Нормальные величины	
Амилаза		16-30 г/л·ч	
Активность АЛАТ		0,10-0,68 ммоль/л·ч	
Активность АсАТ		0,10-0,45 ммоль/л·ч	
Коэффициент де Ритиса		1,33±0,40	
Остаточный азот		14,3-28,6 ммоль/л	
Мочевина		2,5-8,3 ммоль/л	
Креатинин	Женщины	44-97 мкмоль/л	
	Мужчины	52-132 мкмоль/л	
Мочевая кислота		0,12-0,32 ммоль/л	
	Мясная диета	0,16-0,45 ммоль/л	
Белок общий	Взрослые	65-85 г/л	
Фракции белков			
альбумины		30-50 г/л	50-70 %
α_1 -глобулины		1-3 г/л	3-6 %
α_2 -глобулины		6-10 г/л	9-15 %
β -глобулины		7-11 г/л	8-18 %
γ -глобулины		8-16 г/л	15-25 %
Коэффициент альбумины/глобулины		1,2-1,8	
Коэффициент альбумины/($\alpha_1 + \alpha_2$ -глобулины)		3,9-6,1	
Проба Вельтмана		0,4-0,5 мл р-ра CaCl ₂	
Тимоловая проба		0-4 ед.S-N	
Глюкоза		3,3-5,8 ммоль/л	
Тест толерантности к глюкозе			
Натощак		3,3-5,8 ммоль/л	100 %
	Через 60 мин	6,7-9,4 ммоль/л	150-175 %
	Через 120 мин	ниже 6,7 ммоль/л	около 100 %
Коэффициент Бодуэна		около 50 %	
Коэффициент Рафальского		0,9-1,04	
Триацилглицеролы	20-29	0, 5-2,1 ммоль/л	
	30-39	0,5-3,2 ммоль/л	
	40-49	0,6-3,4 ммоль/л	
	50-59	0,6-3,4 ммоль/л	
Холестерол общий	20-29 лет	3,70-6,51 ммоль/л	
	30-39 лет	4,25-7,04 ммоль/л	
	40-49 лет	4,37-7,70 ммоль/л	
	старше 50 лет	4,55-8,24 ммоль/л	

Гемоглобин	Женщины	120-140 г/л
	Мужчины	130--60 г/л
Общий билирубин		3,4-17,1 мкмоль/л
Прямой билирубин		2,2-5,1 мкмоль/л
Калий		3,5-5,1 ммоль/л
Натрий		136-146 ммоль/л
Железо	Мужчины	8,9-28,6 мкмоль/л
	Женщины	7,1-26,8 мкмоль/л
Фосфаты		0,81-1,48 ммоль/л
Кальций		2,0-2,6 ммоль/л
Хлориды		97-108 ммоль/л
рН	Артериальная кровь	7,37-7,45
	Венозная кровь	7,34-7,43
рСО ₂	Мужчины	35-48 мм рт.ст. или 4,66-6,38 кПа
	Женщины	32-45 мм рт.ст. или 4,26-6,00 кПа
Буферные основания		44-48 ммоль/л
Бикарбонаты	Артериальная кровь	21-28 ммоль/л
	Венозная кровь	22-29 ммоль/л
Остаточные анионы		12 ммоль/л
Избыток буферных оснований		от -2 до +3 ммоль/л
рО ₂		83-108 мм рт.ст. или 11,04-14,36 кПа
Оксигемоглобин (HbO ₂)		94-97 %
Насыщение гемоглобина кислородом (HbO _{SAT})		94-98 %

Моча

Амилаза		28-160 г/л·ч
Мочевина		330-580 ммоль/сут
Креатинин		4,4-17,7 ммоль/сут
Мочевая кислота	Обычная диета	1,46-4,43 ммоль/сут
	Мясная диета	2,36-5,90 ммоль/сут
Белок		50-150 мг/сут
Глюкоза		0,06-0,83 ммоль/л или до 0,5 %
рН		5,0-6,5
Удельный вес		1008-1026
Фосфаты		25,8-48,4 ммоль/сут
Кальций		2,5-7,5 ммоль/сут
Хлориды		120-240 ммоль/сут

Клиренс эндогенного креатинина

	Мужчины	Женщины
До 1 года	65-100 мл/мин	65-100 мл/мин
От 1 до 30 лет	88-146 мл/мин	81-134 мл/мин
От 30 до 40 лет	82-140 мл/мин	75-128 мл/мин
От 40 до 50 лет	75-133 мл/мин	69-122 мл/мин
От 50 до 60 лет	68-126 мл/мин	64-116 мл/мин
От 60 до 70 лет	61-120 мл/мин	58-110 мл/мин
Старше 70 лет	55-113 мл/мин	52-105 мл/мин

Желудочный сок

Соляная кислота	Общая кислотность	40-60 ммоль/л
	Свободная HCl	20-40 ммоль/л
	Связанная HCl	10-20 ммоль/л

Понятие нормальной (референтной) величины

Поскольку термин «нормальные величины» труден для толкования, было предложено заменить его понятием «референтные величины», т.е. величины для сравнения (справочные величины).

«Истинно нормальными» величинами лабораторных показателей считают величины, обнаруженные у тщательно обследованной достаточно большой группы лиц в возрасте 20–30 лет без объективных признаков патологии. Референтный интервал выводят при обследовании не менее 120 человек.

Обычно приводят референтный интервал, ограниченный двумя величинами, между которыми располагается ряд, который включает центральные 95% величин. При этом по 2,5% величин с каждой стороны ряда исключаются и отбрасываются. Если результаты лабораторного исследования подчиняются закону нормального распределения, то для их статистической обработки могут применяться параметрические критерии статистики, например, тест Стьюдента для оценки достоверности различий или среднее квадратическое отклонение при оценке разброса результатов. Нормальное распределение всегда предусматривает в интервалах $\bar{X} \pm S$ определённый процент значений. Так, 68,3% результатов лежит в пределах $\bar{X} \pm 1S$, 95,5% – в пределах $\bar{X} \pm 2S$ и 99,7% – в пределах $\bar{X} \pm 3S$. Если распределение не является нормальным или вид распределения определить невозможно из-за малого числа наблюдений (менее 30), то рекомендуют применять непараметрические критерии статистики.

Для всех показателей привести унифицированные референтные величины пока невозможно из-за недостаточной унификации методов лабораторного исследования и обработки полученных результатов. Поэтому в ряде случаев указывают средние величины и средние квадратические отклонения.

ЭТАЛОНЫ ОТВЕТОВ НА ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ И СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

ОТВЕТЫ НА ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Темы 1-2

Номер задания	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Номер ответа	1	1	1	2	1	1	1	3	1	1

Темы 3-4

Номер задания	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Номер ответа	1	1,3	3	1	3	1	2,3	3	1	4

Тема 5

Номер задания	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Номер ответа	3	2	3	1	1	2,3	1,4	4	4	1,3,4

Тема 6-7

Номер задания	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Номер ответа	2	1	1	3	1	3	1	1	2	3

Тема 8

Номер задания	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Номер ответа	4	4	4	1	4	1	1	1	2	4

Тема 9

Номер задания	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Номер ответа	2	3	2	1	4	3	4	2	1	1

Тема 10

Номер задания	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Номер ответа	2	1,2,3	3	3,5	2,3	2,4	1,3,5	2	3	2,4,6

Тема 11

Номер задания	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Номер ответа	3	1	4	1	3	2	2	3	3	1

Тема 12

Номер задания	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Номер ответа	2	3	2	2	1	2	1	2	2	4

ОТВЕТЫ НА СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

Тема 1

1. При 50%-ном насыщении сульфатом аммония в осадке окажутся только глобулины, альбумины останутся в растворе. Чтобы выяснить, были ли в исследуемой жидкости альбумины, необходимо после отделения осадка довести её насыщение сульфатом аммония до 100%-ного. Можно внести в надосадочную жидкость реактивы, осаждающие белки любой природы (ТХУ, сульфосалициловую кислоту, соли тяжёлых металлов) – появление осадка укажет на присутствие альбуминов.

2. Белок: А – будет передвигаться к аноду; Б – при рН 5,0 – к катоду, при рН 7,0 – к аноду; В – при рН 5,0 – к катоду, при рН 9,5 – останется на месте, при рН 11,0 – к аноду.

Темы 3–4

1. Так как эффект адреналина состоит в активации энергетического обмена (борьба или бегство), то его действие должно активировать фермент, обеспечивающий распад жира и его сжигание при мышечной работе. Из условия задачи известно, что гормон усиливает фосфорилирование ферментов, и поэтому логично предположить, что и липаза будет активироваться при фосфорилировании.
2. Происходит конкурентное ингибирование микробных ферментов, ответственных за синтез фолиевой кислоты. В результате происходит нарушение синтеза бактериями собственного тетрагидрофолата. После лечения рекомендовано применение витаминов группы В и пробиотиков для восстановления микрофлоры.

Тема 5

1. В нормальных митохондриях скорость движения электронов по дыхательной цепи строго согласована с потребностью в АТФ. Поэтому, если потребление АТФ сравнительно невелико (т.е. её концентрация высока), то соответственно небольшой оказывается и скорость переноса электронов, которую подавляет наличие высокого электрохимического градиента. Разобщающие агенты нарушают строгое согласование количества АТФ и скорости электронов, встраиваясь в мембрану и вызывая снижение протонного градиента без участия АТФ-синтазы. В результате электроны быстро двигаются по цепи и восстанавливают кислород, однако АТФ не синтезируется и его концентрация низка. Соотношение Р/О, таким образом, снижается. Высокая скорость движения электронов по дыхательной цепи вызывает снижение их свободной энергии, часть которой рассеивается в виде тепла, что и вызывает обильное потоотделение и повышение температуры тела. При использовании разобщителей *in vivo* их эффект по снижению количества АТФ будет проявляться в основном в клетках, имеющих много митохондрий, т.е. в нервных клетках и миокарде, что проявится как нарушение деятельности нервной системы и сердца.
2. Низкий коэффициент Р/О означает, что большая часть энергии веществ рассеивается в виде тепла, а не тратится на синтез АТФ. Это позволяет животным поддерживать температуру тела на нужном уровне. Механизмом, отвечающим за низкий коэффициент Р/О, является разобщение процессов окисления и фосфорилирования. Его обеспечивает термогенин – белок митохондриальной мембраны бурых жировых клеток.

Тема 6-7

1. Нет, уровень сахара в крови ребенка мог повыситься непосредственно перед обследованием вследствие развития стресс-реакции, для которой характерно увеличение уровня адреналина в крови и тканях. Адреналин активирует про-

цессы увеличения концентрации глюкозы в крови (например, гликогенолиз в печени, глюконеогенез).

2. При беге на дистанцию 5000 м лучше, чем на 100-метровой, ткани обеспечиваются кислородом за счет увеличения скорости объема кровотока. Кислородная задолженность организма меньше, поэтому активированы аэробные процессы обмена, уровень молочной кислоты в крови и тканях ниже, чем у спортсмена, пробежавшего 100 м.
3. Одной из функций пентозофосфатного цикла является поставка пентозофосфатов для синтеза нуклеиновых кислот. После кровотока усиливается регенерация элементов крови, для синтеза которых нужны нуклеиновые кислоты. Поэтому усилятся процессы пентозофосфатного цикла, соответственно активируются его ферменты: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, транскетолаза и другие, которые и целесообразно исследовать для проверки вывода.

Тема 8

1. При задержке попадания желчи в двенадцатиперстную кишку нарушается (угнетается) активация панкреатической липазы, ухудшаются переваривание жиров, всасывание жирных кислот и жирорастворимых витаминов, ухудшается моторная функция кишечника, развивается гиперхолестеролемиа.
2. Миокард лучше, чем скелетная мышца, обеспечен энергетическими резервами, в нём содержится больше липидов, при окислении дающих много энергии (1 г углеводов – 4,1 ккал (17,2 кДж), жиры – 9,3 ккал (38,9 кДж). Но в молекуле жирной кислоты значительно меньше, чем в углеводах, кислорода, поэтому на окисление 1 г жира требуется 2019 мл O₂, тогда как на 1 г гликогена всего 829 мл. В энергетическом балансе миокарда ведущую роль играют более эффективные аэробные процессы, но они делают его чувствительным к гипоксии (кислородному голоданию), что может стать причиной инфаркта, тогда как скелетная мышца активно работает и при недостатке кислорода.

Тема 9

1. Низкая кислотность желудочного сока, снижение активности пепсина способствуют развитию микрофлоры, процессов гниения, которые сопровождаются образованием сероводорода. Для нормализации переваривания можно рекомендовать соляную кислоту с пепсином или желудочный сок.
2. Наследственно обусловленный недостаток фенилаланингидроксилазы блокирует метаболические превращения фенилаланина в тирозин. В тканях, крови, моче возрастает содержание фенилаланина, его кето- и оксипродуктов. У ребёнка резко замедляется умственное развитие, поэтому болезнь называется фенилпировиноградная олигофрения или фенилкетонурия. В питании должны быть ограничены продукты с содержанием фенилаланина.

Тема 10

1. Высокая концентрация мочевой кислоты в моче обнаруживается при гиперурикемии любого генеза. В данном случае избыток мочевой кислоты у ребёнка является следствием сильного дефекта фермента гипоксантин-гуанин-

фосфорибозилтрансферазы, ответственного за реутилизацию пуриновых оснований (синдром Леша-Нихана). У взрослых избыток мочевой кислоты бывает при подагре или потреблении пуриносодержащих продуктов.

2. Фолиевая кислота в своей активной форме N^5, N^{10} -метилен-ТГФК участвует в синтезе тимидилмонофосфата (ТМФ), являющегося абсолютно необходимым для синтеза ДНК и, следовательно, для деления клеток. Из-за прекращения деления количество эритроцитов сокращается (анемия), но их рост не останавливается (мегалобластическая), аналогично развивается лейкопения и тормозится деление клеток эпителия (слизистые и кожа).

Тема 11

1. Замедление физического и умственного развития, снижение интенсивности процессов обмена, в том числе энергетического, характерно для гипофункции щитовидной железы (может быть недостаток йода в организме, нарушена центральная регуляция или деятельность самой железы). В выраженной степени болезнь носит название «кретинизм».
2. Указанные жалобы характерны для сахарного и несахарного диабета. Для их дифференциации и оценки состояния метаболизма при диабете целесообразно определять следующие наиболее информативные показатели. Кровь: сахар натощак, кетоновые тела, холестерол и липиды, при необходимости тест толерантности к глюкозе. Моча: сахар, плотность, кетоновые тела. В случае сахарного диабета – недостаточность инсулина β -клеток поджелудочной железы, при несахарном диабете – антидиуретического гормона (вазопрессина, синтезируемого гипоталамусом и секретируемого задней долей гипофиза).

Тема 12

1. В крови при сахарном диабете увеличивается содержание глюкозы (гипергликемия), кетоновых тел (кетонемия), мочевины (азотемия). Накапливается гликозилированный гемоглобин, холестерол. В моче – сдвиг рН в кислую сторону, глюкозурия, кетонурия, азотурия, повышение удельного веса мочи за счёт глюкозы. В данном случае – гипергликемия, при которой превышен почечный порог для глюкозы, которая появляется в моче (около 5 ммоль/л). Гликозилирование гемоглобина является следствием постоянно повышенной концентрации глюкозы в крови.
2. При отравлении СО гемоглобин превращается в карбогемоглобин, не способный связывать и переносить O_2 . Кроме того, СО ингибирует IV комплекс дыхательной цепи митохондрий (цитохромоксидазу), прекращая тканевое дыхание. Гемоглобин имеет четвертичную структуру: объединяет в единую функциональную систему 4 полипептидные цепи (субъединицы) с третичной структурой. Кооперативное взаимодействие 4 субъединиц гемоглобина обеспечивает S-образность кривой его насыщения кислородом. В плазме крови к диагностически значимым ферментам с четвертичной структурой относят креатинфосфокиназу, лактатдегидрогеназу (при инфаркте миокарда диагностически значимы их изоферменты МВ-КФК, ЛДГ₁ и ЛДГ₂).

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Основная литература

1. Биохимия [Электронный ресурс] : учебник для студентов медицинских вузов / ред. Е. С. Северин. – 5-е изд., испр. и доп. – Электрон. текстовые дан. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 768 с. : Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/>
2. Биохимия [Текст] : учебник для студентов медицинских вузов / ред. : Е.С. Северин. – 5-е изд. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 768 с.
3. Биохимия с упражнениями и задачами [Электронный ресурс] : учебник для вузов / ред. Е. С. Северин. – Электрон. текстовые дан. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 384 с. : Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/>
4. Березов, Т. Т. Биологическая химия [Электронный ресурс] : учебник для студентов медицинских вузов / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. – 3-е изд., стереотип. – Электрон. текстовые дан. – М. : Медицина, 2008. – 704 с. : Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/>

Дополнительная литература

1. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии [Электронный ресурс] : пер. с англ. / ред.: К. Уилсон, Дж. Уолкер. – 2-е изд. электронное. – Электрон. текстовые дан. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015. – 1 online, 855 с. : Режим доступа: <http://books-up.ru>
2. Щербак, И. Г. Биологическая химия [Текст] : учебник для студентов медицинских вузов / И. Г. Щербак ; Санкт-Петербургский медицинский университет им. И. П. Павлова (СПб.). – СПб. : СПбГМУ, 2005. – 480 с.
3. Гринштейн, Б. Наглядная биохимия [Текст] : пер. с англ / Б. Гринштейн, А. Гринштейн. – М. : ГЭОТАР Медицина, 2000. – 119 с.
4. Трудные вопросы биохимии [Текст] : избранные лекции по общей и частной биохимии: учебное пособие для студентов / Сибирский медицинский университет (Томск) ; ред. Т. С. Федорова, ред. В. Ю. Серебров. – Томск : б. и., 2006. Часть 1. – 318 с.
5. Клиническая лабораторная диагностика. Интерпретация результатов лабораторных исследований [Электронный ресурс] : учебное пособие / Сибирский медицинский университет (Томск) ; ред. Н. В. Канская ; Сибирский медицинский университет (Томск). – Электрон. текстовые дан. – Томск : Сибирский государственный медицинский университет, 2015. – 144 с. : Режим доступа: <http://irbis64.medlib.tomsk.ru>

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ТЕМА 1. СТРОЕНИЕ, СВОЙСТВА, ФУНКЦИИ АМИНОКИСЛОТ И БЕЛКОВ	6
ТЕМА 2. НУКЛЕОТИДЫ, НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ, НУКЛЕОПРОТЕИНЫ: СТРУКТУРА, СВОЙСТВА, ФУНКЦИИ	20
ТЕМА 3. СТРОЕНИЕ, СВОЙСТВА И ФУНКЦИИ ФЕРМЕНТОВ.....	26
ТЕМА 4. СТРОЕНИЕ, СВОЙСТВА И ФУНКЦИИ ВИТАМИНОВ.....	32
ТЕМА 5. ОБМЕН ВЕЩЕСТВ И ЭНЕРГИИ. БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ.....	42
ТЕМА 6-7. СТРОЕНИЕ, ФУНКЦИИ, АНАЭРОБНЫЙ И АЭРОБНЫЙ ОБМЕН УГЛЕВОДОВ	47
ТЕМА 8. СТРОЕНИЕ, ФУНКЦИИ, ТРАНСПОРТ И ОБМЕН ЛИПИДОВ. НАРУШЕНИЕ МЕТАБОЛИЗМА ЛИПИДОВ.....	62
ТЕМА 9. ОБМЕН БЕЛКОВ. ОБЕЗВРЕЖИВАНИЕ АММИАКА. НАРУШЕНИЕ МЕТАБОЛИЗМА БЕЛКОВ	79
ТЕМА 10. ОБМЕН НУКЛЕОТИДОВ И НУКЛЕОПРОТЕИНОВ. БИОСИНТЕЗ БЕЛКА И ЕГО РЕГУЛЯЦИЯ	98
ТЕМА 11. РЕГУЛЯЦИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ. СТРОЕНИЕ И КЛАССИФИКАЦИЯ ГОРМОНОВ. НАРУШЕНИЯ ГОРМОНАЛЬНОЙ РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЗМА. БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ.....	114
ТЕМА 12. ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ, СВОЙСТВА И ФУНКЦИИ КРОВИ. ОБМЕН ЖЕЛЕЗА. ФУНКЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ. НЕОРГАНИЧЕСКИЕ ВЕЩЕСТВА КРОВИ. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И СОСТАВ МОЧИ В НОРМЕ. ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ КОМПОНЕНТЫ МОЧИ.....	127
ВОПРОСЫ ДЛЯ ИТОВОГО КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ.....	166
СПИСОК ПРИЛОЖЕНИЙ.....	175
ЭТАЛОНЫ ОТВЕТОВ НА ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ И СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ	195
РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА	199

Практическое издание

Авторы

**Наталья Викторовна Канская
Татьяна Васильевна Жаворонок
Наталья Александровна Жуйкова**

**ПРАКТИКУМ
ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ**

Издательство СибГМУ 634050
г. Томск, пр. Ленина, 107
тел. 8(382-2) 51-41-53
E-mail: otd.redaktor@ssmu.ru

Издано в электронном виде. Авт. л. 9,7
