

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

**О.Е. Акбашева, Д.И. Кузьменко, Т.К. Климентьева,
Д.А. Дьяков, О.Г. Шитикова, Е.В. Кайгородова**

РУКОВОДСТВО К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ ПО БИОХИМИИ ОРГАНОВ И СИСТЕМ

для студентов медико-биологического факультета

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

ТОМСК
Издательство СибГМУ
2021

УДК 577.1:612.015](075.8)

ББК 52.57я73

Р 851

Авторы:

О.Е. Акбашева, Д.И. Кузьменко, Т.К. Климентьева,
Д.А. Дьяков, О.Г. Шитикова, Е.В. Кайгородова

Акбашева, О.Е.

Р 851

Руководство к практическим занятиям по биохимии органов и систем: учебное пособие / О.Е. Акбашева [и др.]. – Томск: Изд-во СибГМУ, 2021. – 95 с.

В руководстве изложены современные биохимические методические подходы, позволяющие оценивать функциональное состояние различных органов и систем организма в норме и при патологии, а также представлены примеры использования полученных результатов в клинической лабораторной диагностике.

Издание подготовлено в соответствии с Федеральным государственным образовательным стандартом высшего образования для студентов медико-биологического факультета, обучающихся по основным профессиональным образовательным программам – программам специалитета по специальности 30.05.01 – Медицинская биохимия.

Руководство может представлять интерес также для студентов и аспирантов медицинских и биологических специальностей различных вузов, а также специалистов в области нормальной и патологической физиологии.

УДК 577.1:612.015](075.8)

ББК 52.57я73

Рецензент:

И.В. Петрова – доктор биологических наук, профессор кафедры биофизики и функциональной диагностики ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России.

Утверждено и рекомендовано к печати учебно-методической комиссией Медико-биологического факультета ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (протокол № 1 от 12 января 2021 г.).

© Издательство СибГМУ, 2021

© Акбашева О.Е., Кузьменко Д.И., Климентьева Т.К.,
Дьяков Д.А., Шитикова О.Г., Кайгородова Е.В., 2021

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	5
Список сокращений	6
РАЗДЕЛ 1. БИОХИМИЯ ПЕЧЕНИ	7
Тема 1.1. ПИГМЕНТНЫЙ ОБМЕН	7
1.1.1. Определение дельта-аминолевулиновой кислоты	10
1.1.2. Определение концентрации креатинина методом Яффе .	11
1.1.3. Определение копропорфирина и уропорфирина	12
Тема 1.2. МЕТАБОЛИЗМ КСЕНОБИОТИКОВ	14
1.2.1. Выделение микросомальной фракции печени	15
1.2.2. Определение активности глюкозо-6-фосфатазы в гомогенате печени	16
1.2.3. Определение активности пероксидазы в микросомальной фракции печени	18
Семинар: «Синтезирующая и детоксицирующая функции печени»	19
Тестовые задания.....	20
Раздел 2: БИОХИМИЯ МЫШЦ	27
Тема 2.1. ИСТОЧНИКИ ЭНЕРГИИ ДЛЯ МЫШЕЧНОГО СОКРАЩЕНИЯ	27
2.1.1. Выделение миозина из скелетных мышц животных	28
2.1.2. Определение АТФ-азной активности миозина	31
Семинар: «Энергетический обмен в мышечных тканях»	32
Тестовые задания.....	33
Раздел 3: БИОХИМИЯ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ	39
Тема 3.1. БИОХИМИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА	39
3.1.1. Выделение коллагена из сухожилий животных	39
3.1.2. Определение гидроксипролина.....	40
Тема 3.2. БИОХИМИЯ КРОВИ. ГЕМОСТАЗ	42
3.2.1. Определение концентрации фибриногена.....	46
3.2.2. Определение АПТВ (АЧТВ)	50
3.2.3. Определение протромбинового времени.....	52
3.2.4. Определение тромбинового времени.....	54
3.2.5. Тест генерации тромбина	55
3.2.6. Определение концентрации антитромбина	57
3.2.7. Глобальные тесты в оценке системы гемостаза	59

Семинар: «Биохимический состав соединительной ткани».....	63
Тестовые задания.....	64
Семинар: «Биохимия жировой ткани».....	70
Тестовые задания по теме: «Биохимия жировой ткани»	71
Тестовые задания по теме: «Биохимия крови».....	73
Раздел 4. БИОХИМИЯ НЕРВНОЙ ТКАНИ	80
Тема 4.1. НЕЙРОМЕДИАТОРЫ И НЕЙРОПЕПТИДЫ	80
4.1.1. Общая характеристика иммуноферментного метода	82
4.1.2. Определение содержания серотонина в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа	84
Семинар: «Биохимические механизмы и физиологические эффекты биоактивных веществ».....	86
Тестовые задания.....	87
 ТВОРЧЕСКИЕ ЗАДАНИЯ.....	 90
ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К ЗАЧЁТУ	90
ОТВЕТЫ НА ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ	91
РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА.....	94

ВВЕДЕНИЕ

Целью изучения дисциплины «Биохимия органов и систем» является освоение студентами современных знаний о специфике структурно-функциональной организации различных тканей организма человека, формирование представлений о молекулярно-клеточных основах патогенеза нарушений метаболизма тканей и систем, а также умений анализировать и интерпретировать информацию, полученную в ходе изучения состояния метаболизма отдельных органов в норме и при патологии.

Практикум подготовлен в соответствии с Федеральным государственным образовательным стандартом высшего образования для студентов медико-биологического факультета по специальности 30.05.01 – Медицинская биохимия.

Знания и навыки, полученные студентами в результате изучения дисциплины, составят основу для успешной работы как в клиничко-диагностических лабораториях, так и в научно-исследовательских учреждениях медико-биологического профиля.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ	– аденозиндифосфат
АЛК	– аминоклевулиновая кислота
АТ III	– антитромбин III
АТФ	– аденозинтрифосфат
АЧТВ	– активированное частичное тромбопластиновое время
Г-6-Фаза	– глюкозо-6-фосфатаза
ГАГ	– глюкозаминогликаны
ГАМК	– гамма-аминомасляная кислота
ГЛЮТ 2	– глюкозный транспортер, тип 2
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ДОФА	– 3,4-дигидроксифенилаланин
ДЦЖК	– длинноцепочечные жирные кислоты
КП	– копропорфирин
КПГ	– копропорфириноген
ЛДГ	– лактатдегидрогеназа
ЛПВП	– липопротеины высокой плотности
ЛПНП	– липопротеины низкой плотности
ЛПОНП	– липопротеины очень низкой плотности
МНО	– международное нормализованное отношение
НАД⁺	– никотинамидадениндинуклеотид окисленный
НАДФН	– никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный
НП	– нейропептид
ПБГ	– порфобилиноген
ППЦ	– полипептидная цепь
ПТВ (ПВ)	– протромбиновое время
ПХМБ	– парахлормеркурибензоат
РЭС	– ретикуло-эндотелиальная система
ТАГ	– триацилглицерол
ТХУ	– трихлоруксусная кислота
ХМ	– хиломикроны
цАМФ	– циклический аденозинмонофосфат
ЦНС	– центральная нервная система
ЭПР	– эндоплазматический ретикулум
НЬ	– гемоглобин
P1NP	– пропептид коллагена I типа
P1CP	– C-концевой телопептид коллагена II типа

БИОХИМИЯ ПЕЧЕНИ

Тема 1.1. ПИГМЕНТНЫЙ ОБМЕН

Актуальность

Пигменты, или окрашенные соединения небелкового характера, могут находиться в организме человека в свободном и связанном состоянии.

Основными структурными компонентами пигментов являются пиррольные кольца, связанные между собой метиновыми группами (=CH-). С диагностической точки зрения в биологических жидкостях определяют пигменты красного цвета – порфирины и желчные пигменты. Основное содержание порфиринов приходится на долю гемопротеинов. Гем представляет собой протопорфирин, связанный с двухвалентным железом. Желчными пигментами называют продукты распада гемоглобина и других хромопротеинов.

Основным желчным пигментом человека является билирубин. Это продукт деградации гемоглобина, высвобождаемого из эритроцитов, завершивших 120-суточный срок жизни. В клетках ретикулоэндотелиальной системы (РЭС) селезёнки, печени и костного мозга происходит лизис эритроцитов и трёхэтапная трансформация гемоглобина: гемоглобин → вердоглобин → биливердин → билирубин.

Образовавшийся билирубин называется свободным (неконъюгированным, несвязанным) или непрямой билирубином. Вследствие гидрофобности свободного билирубина, при его количественном определении методом Йендрашика–Клеггорна–Грофа, пробу сыворотки сначала обрабатывают кофеиновым реактивом, переводя этот билирубин в водорастворимую форму. В результате свободный билирубин (не прямо) приобретает способность взаимодействовать с диазореактивом Эрлиха. Верхняя граница нормы концентрации свободного (непрямого) билирубина в крови составляет 15,0 мкмоль/л (около 75–80% от содержания общего билирубина). Концентрация общего билирубина в норме находится в пределах от 8,5 до 20,5 мкмоль/л.

Свободный (непрямой) билирубин токсичен. Благодаря липофильности он взаимодействует с клеточными мембранами, что вызывает дисбаланс ионов, нарушение биоэнергетики клетки, подавление биосинтеза белка и ряд других негативных эффектов. Клетки центральной нервной системы наиболее чувствительны к этим сдвигам.

Обезвреживание прямого билирубина происходит исключительно в печени. В эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) гепатоцитов с участи-

ем УДФ-глюкуронилтрансферазы, каждая молекула свободного билирубина образует конъюгат с двумя остатками глюкуроновой кислоты. Продукт – билирубин диглюкуронид представляет собой, гидрофильную молекулу – прямой билирубин, или конъюгированный, связанный билирубин. В составе желчи он поступает в кишечник, где с участием ферментов кишечной микрофлоры подвергается окончательной деградации с образованием нетоксичных водорастворимых продуктов (уробилин, стеркобилин), которые выводятся из организма. Билирубин диглюкуронид (прямой билирубин) проходит через почечный барьер. Поскольку в норме содержание прямого билирубина в крови незначительно, в моче здорового человека билирубин не улавливается стандартным лабораторным методом. По этой причине принято считать, что в норме билирубин в моче отсутствует. Верхняя граница нормы концентрации прямого билирубина в крови здорового человека составляет 51 мкмоль/л.

Повышение концентрации билирубина в сыворотке крови (гипербилирубинемия) сопровождается желтухой. Единственный вариант физиологической желтухи – желтуха новорождённых. Остальные случаи желтух – симптом различных приобретённых и врожденных заболеваний печени, желчных путей, а также патологий, сопровождающихся массивным гемолизом. В зависимости от уровня на котором произошло нарушение метаболизма билирубина, различают следующие формы желтух: а) гемолитическая (надпечёночная) желтуха; б) паренхиматозная (печёночная, печеночно-клеточная или истинная) желтуха и в) механическая (подпечёночная или обтурационная) желтуха.

В клинике для дифференциальной диагностики желтух, наряду с определением в сыворотке крови концентрации общего билирубина и его фракций (прямого и непрямого билирубинов), определяют содержание билирубина и уробилина в моче, а также стеркобилина в кале.

Порфирины представляют собой азотистые пигменты, обладающих общей основной структурой – порфином, который состоит из 4 пиррольных колец. В зависимости от того, какими радикалами замещены атомы водорода в порфине, образуются различные типы порфиринов – уропорфирин, копропорфирин, протопорфирины. Восстановленные формы порфиринов называют протопорфириногенами. Они являются бесцветными предшественниками порфиринов. Дельта аминолевулиновая кислота необходима для синтеза гема, является предшественником порфобилиногена, который в свою очередь является предшественником уропорфириногена и копропорфириногена (*рис. 1*). Порфирины входят в состав сложных белков: гемоглобина, миоглобина, цитохромов, каталаз.

Определение порфиринов в биологическом материале имеет диагностическое значение при ряде патологических состояниях – анемиях, гепатите, отравлении свинцом и особенно при порфириях. Повышенное содержание порфиринов может быть связано с увеличением их синтеза в различных клетках организма или недостаточности ферментов, участвующих в их обмене. Порфирии представляют собой заболевания, чаще

всего обусловленные генетическим нарушением ферментных систем. Существуют различные формы порфирий: печеночная, эритропоэтическая и др.

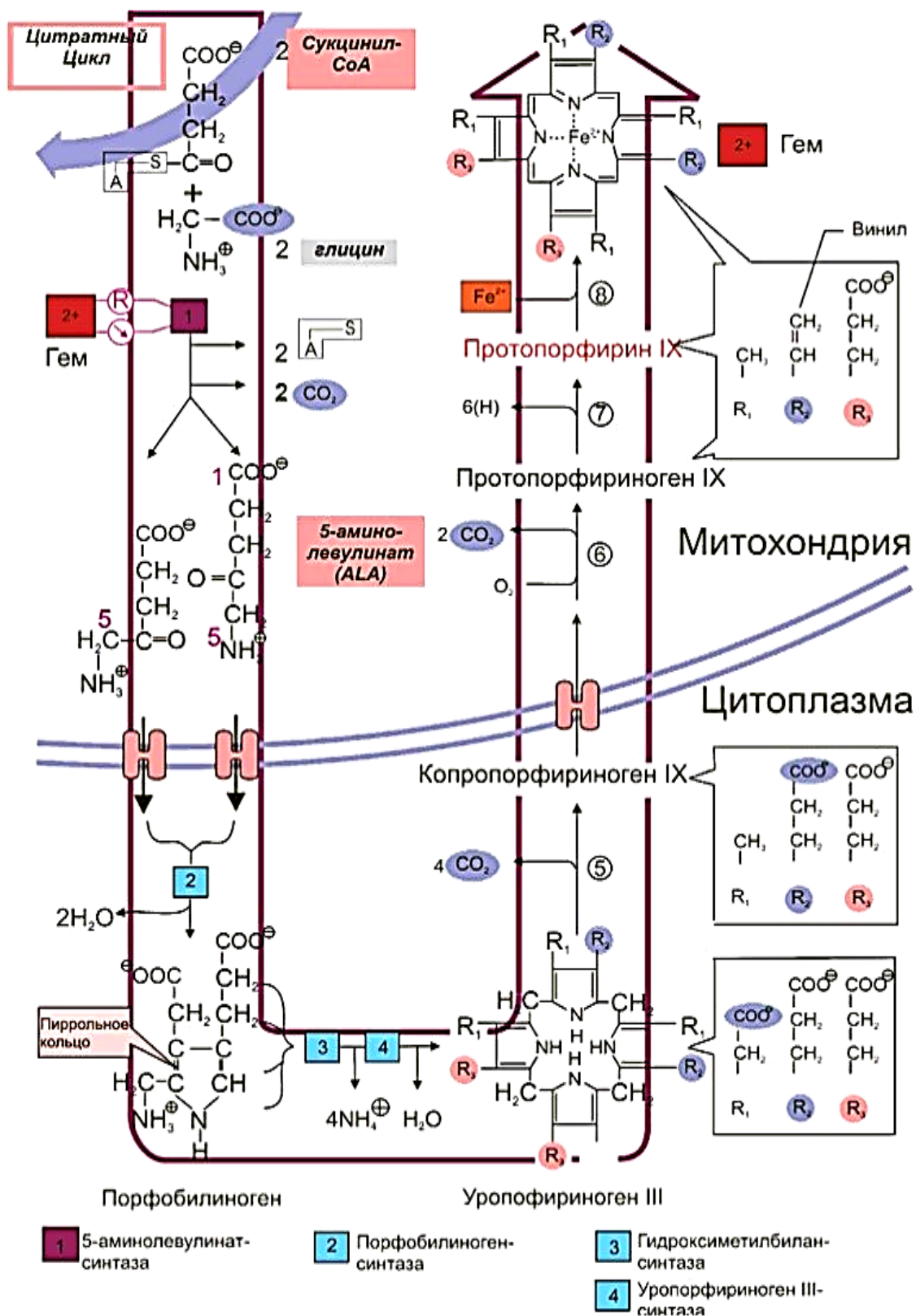


Рис. 1. Синтез гема [Я. Кольман, К.-Г. Рем, 2018]

1.1.1. Определение дельта-аминолевулиновой кислоты

Аминолевулиновая кислота – основной этап синтеза порфириновых структур (из глицина и сукцинил КоА), а значит и гемоглобина.

Принцип метода

Дельта-аминолевулиновая кислота (АЛК) определяется по реакции с реактивом Эрлиха после удаления порфобилиногена (ПБГ) и других мешающих определению веществ сорбированием их на активированном угле.

Реактивы:

1. Хлорная кислота 57%.
2. Ацетат натрия 3-х водный х.ч.
3. Ацетилацетон ч.д.а.
4. Ледяная уксусная кислота.
5. Диметиламинобензальдегид, ч.
6. Взвесь угля (*Приготовление: 0,25 г активированного угля растворяют в 10 мл ацетатного буфера рН 3,6*).
7. Ацетатный буфер, рН 3,6 (*Приготовление: **Раствор А:** 11,55 мл ледяной уксусной кислоты разводят в колбе на 1000 мл. **Раствор Б:** 27,2 г ацетата натрия 3-х водного растворяют в мерной колбе на 1000 мл. Ацетатный буфер готовят в мерной колбе на 1000 мл смешивая 463 мл раствора А и 37 мл раствора Б и доводят объем до метки дистиллированной водой*).
8. Реактив Эрлиха (*Приготовление: 1 г диметиламинобензальдегида растворяют в 37 мл ледяной уксусной кислоты, добавляют 8 мл 57% хлорной кислоты затем доводят объем до 50 мл ледяной уксусной кислотой*).
9. Фильтровальная бумага (синяя лента).
10. Пробирки с притертой пробкой.
11. Набор реагентов для определения креатинина.

Проведение анализа

К 1,0 мл мочи в пробирке с притертой пробкой добавляют 9,0 мл взвеси активированного угля в ацетатном буфере (рН 3,6). Суспензию взбалтывают 1 мин и фильтруют через бумажный фильтр (синяя лента).

В две пробирки отбирают по 2 мл фильтрата. Одну пробирку используют в качестве холостой пробы. В пробирку с опытной пробой добавляют 0,05 мл ацетилацетона и тщательно перемешивают. Затем пробирки с опытной и холостой пробой помещают на 20 мин в кипящую водяную баню (пробирки закрыть фольгой).

Пробы охлаждают, затем добавляют по 2,0 мл реактива Эрлиха и перемешивают. Через 15 мин опытную пробу фотометрируют при длине волны 553 нм.

Содержание АЛК в пробе определяют по калибровочному графику (табл. 1).

Таблица 1

*Схема приготовления калибровочных растворов
для определения содержания АЛК*

№	Рабочий калибровочный раствор	Ацетатный буфер, рН 3,6	Содержание АЛК в пробе (2 мл)		Оптическая плотность
			мкг	мкмоль	
1	0,1	4,9	0,04	0,0003	0,04
2	0,3	4,7	0,12	0,0009	0,08
3	0,5	4,5	0,2	0,0015	0,12
4	0,7	4,3	0,28	0,0021	0,16
5	1,0	4,0	0,4	0,003	0,21
6	2,0	3,0	0,8	0,006	0,26

Коэффициент пересчета мкг в мкмоль равен 0,0076.

Поскольку диурез за сутки может быть различным, более достоверным показателем считается содержание АЛК в пересчете на 1 г креатинина, которое производится по формуле:

$$\text{АЛК} = (10 \times \text{С}) / (2 \times \text{А}),$$

где:

С – количество АЛК в пробе (мкмоль), найденного по калибровочному графику, А – содержание креатинина в пробе (г), 10 – коэффициент разведения мочи, 2 – объем фильтрата (мл). Содержание АЛК в моче выражается в мкмоль/г креатинина.

Содержание креатинина определяют методом Яффе.

1.1.2. Определение концентрации креатинина методом Яффе

Принцип метода

Определение концентрации креатинина основано на измерении скорости образования окрашенного комплекса, возникающего в результате реакции между креатинином и пикриновой кислотой в щелочной среде.

Подготовка исследуемого материала: непосредственного перед анализом развести мочу дистиллированной водой в соотношении 1:49.

Приготовление рабочего реагента: смешать Реагент 1 и Реагент 2 в соотношении 1:1 (рабочий реагент стабилен не менее 21 дня при температуре 18–25 °С в темноте).

Проведение анализа

Внести в пробирку	Опытная проба	Калибратор
Рабочий реагент, мкл	1000	1000
Исследуемый образец, мкл	200	-
Калибратор, мкл	-	200

Пробы тщательно перемешать. Через 60 с измерить экстинкцию (E_1). Еще через 60 с повторно измерить экстинкцию (E_2). Вычислить величину $\Delta E_{\text{пробы}} = E_2 - E_1$. Провести аналогичную процедуру для калибратора и вычислить $\Delta E_{\text{калибратора}}$. Расчет содержания креатинина в моче: $C = 8,85 \times \Delta E_{\text{пробы}} / \Delta E_{\text{калибратора}}$ (ммоль/л).

Референтные значения

В норме содержание АЛК в моче составляет 3,9–19 мкмоль на 1 г креатинина (0,52–2,5 мг на 1 г креатинина).

Практическая значимость

Выделение аминолевулиновой кислоты (АЛК) может быть увеличено за счёт унаследованных острых порфирий или из-за вторичного ингибирования дегидратазы АЛК. Среди вторичных причин, острая интоксикация свинцом приводит к наибольшему увеличению аминолевулиновой ацидурии. Менее значительные повышения проявляются при хронической интоксикации свинцом, бензолом, тирозинемии I типа, алкоголизме и беременности.

1.1.3. Определение копропорфирина и уропорфирина

Принцип метода

Используется унифицированный метод Соулсби в модификации Римингтона. Метод основан на экстракции копропорфирина (КП) и копропорфириногена (КПГ) из мочи в кислой среде с последующим переводом КПГ в КП йодом, реэкстракции КП кислотой и спектрофотометрическое определение его разницы оптической плотности при трех длинах волн.

Реактивы:

1. Ледяная уксусная кислота, х.ч.
2. Эфир медицинский.
3. 1,4 моль/л раствор HCl (*Приготовление: 11,66 мл концентрированной кислоты смешать с дистиллированной водой в колбе на 100 мл*).
4. Спиртовой раствор йода 0,039 моль/л (*Приготовление: 0,096 г I_2 смешать с этанолом в колбе на 100 мл*).
5. Раствор йода в HCl (*Приготовление: смешивают спиртовой раствор йода и соляную кислоту в соотношении 1:200 (25 мкл йода + 5 мл HCl). Раствор готовят ex tempore*).
6. Набор реагентов для определения креатинина.

Проведение анализа

В пробирку вносится 2,0 мл мочи, 0,2 мл ледяной уксусной кислоты и 5 мл эфира. Встряхивают в течение 1 мин. После разделения фаз, нижний водный слой отбрасывают.

К верхнему эфирному слою добавляют 5 мл раствора йода в соляной кислоте и встряхивают в течение 1 мин. После разделения фаз нижний слой переносят в чистую пробирку, термостатируют при 37 °С в течение 5 мин.

Затем содержимое пробирки встряхивают и измеряют оптическую плотность раствора с использованием спектрофотометра СФ-2000 («Спектр, Россия) при трех длинах волн: 380, 402 и 430 нм против 1,41 моль/л раствора HCl.

Учитывая, что диурез за сутки может быть разным, более достоверным показателем считают содержание КП в пересчете на креатинин (см. выше).

Содержание КП в моче (нмоль/г креатинина) рассчитывают по формуле:

$$\text{КП} = ([2 \times E_{402} - (E_{430} + E_{380})] \times 2,093 \times 1,52) / A ,$$

где:

E_{402} , E_{430} , E_{380} – оптическая плотность раствора при соответствующих длинах волн; A – содержание креатинина в пробе (г); 1,52 – коэффициент пересчета микрограммов КП в наномоли; 2,093 – коэффициент для расчета содержания КП, предложенный Ремингтоном.

Референтные значения

В норме содержание копропорфирина в моче составляет 30,5–122 нмоль/г креатинина (2–80 мкг/г креатинина).

Практическая значимость

Анализ на копропорфирины используется для диагностики вторичных нарушений обмена порфиринов (вторичных порфирий). Патология развивается вследствие поражения печени при интоксикациях или других основных заболеваниях (гепатиты, цирроз печени, эритропоэтическая уропорфирия).

Тема 1.2. МЕТАБОЛИЗМ КСЕНОБИОТИКОВ

Актуальность

Ксенобиотики – чужеродные для человека вещества природного и синтетического происхождения. Они попадают в организм из окружающей среды с пищей, питьевой водой, со вдыхаемым воздухом, всасываются через слизистые оболочки или проникают в кровь через дефекты кожных покровов. В организме ксенобиотики не включаются ни в один из естественных метаболических процессов. Большинство ксенобиотиков вызывают отравления, мутагенез и инициируют злокачественные новообразования. В отличие от водорастворимых (гидрофильных) ксенобиотиков, липофильные (гидрофобные) ксенобиотики способны накапливаться в организме, что потенцирует их токсичность.

Ферментные системы обезвреживания (детоксикации или биотрансформации) ксенобиотиков особенно активны в клетках тканей, которые образуют биологический барьер между внутренней средой организма и окружающей средой. Печень, в силу своего анатомического положения и существенной массы, является важнейшим участником процессов детоксикации ксенобиотиков. Через печеночную артерию печень может получать ксенобиотики из большого круга кровообращения, а через воротную вену – ксенобиотики, поступившие с пищей и питьевой водой.

Ферментные системы детоксикации (биотрансформации) ксенобиотиков представлены цитохром Р-450-зависимыми монооксигеназами, которые встроены в мембраны гладкого ЭПР. Системы отличаются широкой субстратной специфичностью, что обусловлено существованием нескольких сотен изоформ цитохрома Р-450. Монооксигеназы катализируют включение одного атома молекулярного кислорода в состав молекулы ксенобиотика, в то время как другой его атом восстанавливается до воды. Для функционирования монооксигеназ требуются внешние источники (доноры) электронов, которые передаются на молекулярный кислород. Итогом работы монооксигеназных систем клеток является трансформация исходно гидрофобного (неполярного) ксенобиотика в полярный, то есть водорастворимый, продукт. Благодаря этому не только снижается токсичность ксенобиотика, но и появляются условия для его удаления из организма и исключается накопление.

Монооксигеназная система детоксикации ксенобиотиков также участвует в обезвреживании естественных токсичных метаболитов, а также биологически активных веществ (гормонов, витаминов, биогенных аминов) образующихся в ходе некоторых метаболических процессов. Примером может служить биотрансформация токсичного гидрофобного непрямого билирубина в водорастворимый прямой билирубин.

Детоксикация (биотрансформация) ксенобиотиков состоит из двух фаз. I фазу (химическая модификация) осуществляют цитохром Р-450-

зависимые монооксигеназы ЭПР. В результате в молекуле гидрофобного ксенобиотика появляются полярные функциональные группы, что придаёт гидрофильные свойства ксенобиотику и этим уже снижает его токсичность. II фаза (конъюгация) обеспечивает присоединение к функциональным группам молекулы ксенобиотика высокополярных соединений, несущих отрицательные электрические заряды, что приводит к образованию различных конъюгатов ксенобиотика. Этим завершается превращение изначально гидрофобного ксенобиотика в гидрофильный малотоксичный продукт, который легко выводится из организма почками. Большинство реакций II фазы протекают в цитоплазме. Водорастворимые ксенобиотики подвергается детоксикации с помощью реакций II фазы, то есть, «в обход» I фазы.

Эндоплазматический ретикулум (ЭПР) заполняет внутриклеточное пространство, свободное от ядер, митохондрий и других субклеточных органелл. ЭПР представлен сложной системой трубочек и уплощенных мешочков (цистерн). При приготовлении тканевого гомогената ЭПР неизбежно разрушается. Его фрагменты спонтанно замыкаются, образуя мембранные пузырьки диаметром от 50 до 150 нм. При этом ориентация наружного и внутреннего листков мембранного бислоя микросом, равно как и связанных с ними ферментных систем и рибосом, точно соответствует таковой в интактном ЭПР. Фракцию микросом можно выделить из гомогената методом дифференциального центрифугирования. Для этого надосадочную фракцию, полученную после осаждения ядер, митохондрий и лизосом, центрифугируют при 100000 g.

Одним из маркерных ферментов ЭПР является глюкозо-6-фосфатаза, катализирующая реакцию гидролиза глюкозо-6-фосфата до свободной глюкозы и неорганического фосфата:



Фермент содержится в клетках печени и почек. Состоит из нескольких субъединиц, прочно связанных с мембранами ЭПР. Глюкозо-6-фосфатаза играет ключевую роль в стабилизации постоянства концентрации глюкозы в крови, поскольку катализирует последние этапы глюконеогенеза и гликогенолиза. Свободная глюкоза посредством ГЛЮТ2 поступает из клеток в кровь.

1.2.1. Выделение микросомальной фракции печени

Наиболее активно ферментативные превращения ксенобиотиков осуществляются в клетках печени. Среди них следует отметить реакции окисления веществ, осуществляемые монооксигеназной ферментативной системой мембран эндоплазматической сети (микросом) печени. В микросомальной цепи протекают окислительные реакции двух типов: реакции гидроксирования природных (аутобиогенных) и чужеродных

соединений и реакции пероксидного окисления ненасыщенных жирных кислот.

Принцип

Метод основан на разной скорости осаждения субклеточных частиц печени при центрифугировании в зависимости от их размера и плотности. Для уменьшения фактора осаждения микросом добавляется хлорид кальция, вызывающий их преципитацию.

Реактивы:

1. 1,15% раствор хлорида калия.
2. 0,1 М трис-буфер, рН 7,4.
3. 0,04 М раствор хлорида кальция.

Ход выделения фракции микросом

Печень отмывают от крови раствором хлорида калия из шприца, обсушивают ее фильтровальной бумагой и помещают в чашку Петри, стоящую на льду.

Навеску из 1,5 г ткани печени измельчают ножницами и переносят в стакан гомогенизатора, куда предварительно наливают 4,5 мл охлажденного раствора хлорида калия. Стакан помещают в лед и размельчают ткань с помощью тефлонового пестика при 1000 об./мин, делая 15–20 движений стаканом вверх-вниз.

Гомогенат разливают по 1,5 мл в эппендорфы и центрифугируют при 10000g в течение 20 мин при 0–4 °С. Надосадочную жидкость сливают в мерный цилиндр (один эппендорф оставляют для определения активности глюкозо-6-фосфатазы и активности пероксидазы), прибавляют к ней раствор хлорида кальция в соотношении 1:5 по объему. Перемешивают вновь разливают в чистые эппендорфы и центрифугируют при 3000 g в течение 15 мин при 0–4 °С.

Надосадочную жидкость сливают. К осадку, содержащему обогащенную фракцию микросом добавляют 3 мл раствора трис-буфера и с помощью пипетки, втягивая и выдувая жидкость, получают взвесь микросом (чистоту фракции проверяют по активности глюкозо-6-фосфатазы, а также определяют активность пероксидазы).

1.2.2. Определение активности глюкозо-6-фосфатазы в гомогенате печени

Глюкозо-6-фосфатаза (Г-6-Фаза, КФ 3.1.3.9) представляет собой высокоспецифичную фосфогидролазу по отношению к D-глюкозо-6-фосфату. Г-6-Фаза содержится в основном в микросомах печени, почек и слизистой оболочке тонкого кишечника. Фермент имеет широкий оптимум рН между 6,0–7,0. Обычно его активность измеряют при рН 6,5.

Принцип метода

Об активности реакции, катализируемой Г-6-Фазы, можно судить по скорости увеличения концентрации неорганического фосфата, освобождаемого в результате гидролиза субстрата D-глюкозо-6-фосфата, в среде инкубации.

Реактивы:

1. 0,1 М цитратный буфер, рН 6,5 (*Приготовление: 2,101 г лимонной кислоты растворяют в 50–75 мл дистиллированной воды в мерной колбе на 100 мл, значение рН доводят до 6,5 при помощи 30% NaOH, доливают до метки водой*).
2. 0,08 М р-р глюкозо-6-фосфата (*Приготовление: 417 мг бариевой соли глюкозо-6-фосфата суспендируют в 2–3 мл дистиллированной воды. Добавляют столько 1N раствора HCl, чтобы соль растворилась. Затем добавляют 114 мг Na₂SO₄ или 139 мг K₂SO₄. Тщательно перемешивают и центрифугируют. Осадок BaSO₄ отбрасывают. К надосадочной жидкости осторожно добавляют каплю раствора Na₂SO₄. Осадок не должен образоваться. Значение рН доводят до 6,5 при помощи 30% раствора NaOH, доливают дистиллированной водой до 10 мл*).
3. 10% р-р ТХУ.
4. 2,5% раствор молибдата аммония (*Приготовление: 2,5 г молибденовокислого аммония растворяют в 60 мл дистиллированной воды, фильтруют. Раствор вносят в мерную колбу на 100 мл. В другой колбе к 25 мл дистиллированной воды приливают 7,7 мл концентрированной H₂SO₄. Второй раствор приливают к первому и после охлаждения доводят водой до метки*).
5. 1% р-р аскорбиновой кислоты (*ex tempore*).

Проведение анализа

На каждую пробу ставят одну контрольную пробу №1 (КП №1), а на каждую серию – дополнительно одну контрольную пробу №2 (КП №2). В центрифужные пробирки отмеривают:

	Опытная проба	КП №1	КП №2
Фильтрованный гомогенат, мл	0,1	0,1	-
Инкубация 5 мин при 37 °С			
0,08 М р-р глюкозо-6-фосфата, мл	0,1	-	0,1
0,1 М цитратный буфер, рН 6,5, мл	-	0,1	0,1
Содержимое перемешивается, отмечается время каждого добавления. Инкубирование проб в течение 15 мин при 37 °С			
10% р-р ТХУ, мл	2,0	2,0	2,0
Цетрифугирование в течение 10 мин при 3000 об./мин			

В надосадочной жидкости (супернатанте) проводят количественное определение неорганического фосфата. К 1,5 мл центрифугата добавляют 1,0 мл молибденового реактива, затем 1,0 мл 1% раствор аскорбиновой кислоты и спустя 10 мин измеряют оптическую плотность на красном светофильтре в кювете с толщиной рабочего слоя 0,5 см.

Расчет активности глюкозо-6-фосфатазы в пробе проводят по формуле:

$$\text{Активность Г-6-Фазы (мкмоль Фн/проба)} = (E_v - E_{k1})/E_s \times [P] \times 2,2 ,$$

где:

E_v – экстинкция раствора опытной пробы; E_{k1} – экстинкция раствора контрольной пробы №1; E_s – экстинкция раствора стандартной пробы; $[P]$ – мкмоль Фн в стандартной пробе (0,5 мкмоль); 2,2 – объем пробы (мл) после добавления ТХУ.

Для пересчета содержания неорганического фосфата в мкмоль Фн/мин×г ткани результат следует умножить на $1000/(15 \times 2,5)$, где 2,5 – мг ткани в пробе для ферментативной реакции; 15 – время реакции, мин; 1000 – пересчет для перехода от мг к граммам.

Практическое значение

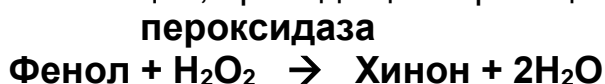
Активность фермента позволяет оценить функциональное состояние микросомальной фракции печени как обезвреживающей системы.

1.2.3. Определение активности пероксидазы в микросомальной фракции печени

Пероксидазы (КФ 1.11.1.1-10) – гемопротейны, относящиеся к окислительно-восстановительным ферментам, использующих в качестве акцепторов электронов перекиси водорода (H_2O_2). Пероксидаза участвует в окислении различных субстратов на мембранах митохондрий и микросом. Пероксидаза окисляет вещества с участием перекиси водорода (например, пирокатехин, пирогаллол, ароматические амины) и оксидазной, т.е. осуществляет катализ субстратов за счет молекулярного кислорода без участия H_2O_2 (например, окисление НАД·Н, НАДФ·Н, оксалата, фенилпирувата).

Принцип метода

Активность фермента измеряют фотометрически при длине волны 440 нм. При окислении некоторых фенолов (например, гваякола) пероксидазой образуется окрашенный продукт, и оптическая плотность раствора увеличивается. Реакция, проходящая в реакционной среде:



Реактивы:

1. 0,3% р-р перекиси водорода;
2. 0,06 М фосфатный буфер, рН 6,7;
3. 0,02% р-р фенола.

Проведение анализа

В кюветы толщиной 1 см (контрольная и опытная) вносят по 1 мл микросом и добавляют 1 мл 0,06 М фосфатного буфера (рН 6,7), затем 2 мл 0,02% р-р фенола.

В опытную пробу вносят 2 мл 0,3% р-ра перекиси водорода и одновременно включают секундомер. Записывают значения оптической плотности через каждые 5 (20–60) с. Необходимо снять 5–10 точек.

Строится график зависимости оптической плотности D_{440} от времени t . На графике находят линейный участок и вычисляют скорость изменения оптической плотности $D'_{440} = (D_{4402} - D_{4401}) / (t_2 - t_1)$.

Активность ферментов пересчитывают на мг белка в пробе. Пробы разводят в 1000 раз и измеряют оптическую плотность при 280 и 260 нм (против воды).

$$\text{мг/мл} = (1,45 \times E_{280} - 0,74 \times E_{260}) \times 1000$$

Активность пероксидазы (А) рассчитывается по формуле:

$$A = (D' \times N) / (m_{(\text{мг белка})} \times l_{(\text{кюв.})}) \quad [(\text{ед.опт.плотн.}) / (\text{мг белка} \times \text{сек})],$$

где:

D'_{440} – скорость изменения оптической плотности [ед.опт.плотн./с];

N – разведение; $m_{(\text{мг белка})}$; $l_{(\text{кюв.})}$ – толщина кюветы, см.

Практическое значение

Пероксидаза – фермент антиоксидантной системы. Например, глутатион-пероксидаза, широко распространена в клетках животных и растений. Глутатион-пероксидаза состоит из 4 субъединиц в каждой из которых содержится по молекуле селена. В клетках фермент располагается в цитозоле и матриксе митохондрий. Этот фермент защищает мембраны и гемоглобин от окисления пероксидами.

СЕМИНАР

«Синтезирующая и детоксицирующая функции печени»

1. Краткая характеристика специфических метаболических функций печени.
2. Функции печени в целом.

3. Уреогенез: реакции, компартиментализация процесса, значение для организма.
4. Кетогенез: реакции, значение кетоновых тел для биоэнергетики клеток ЦНС и других органов.
5. Роль печени в пигментном обмене: реакции трансформации прямого билирубина в прямой и катализирующие их ферменты гепатоцитов. Завершение биотрансформации прямого билирубина в просвете кишечника.
6. Желтуха, как симптом. Гемолитическая, паренхиматозная и обтурационная типы желтух. Этиология, биохимический патогенез и клинико-лабораторные признаки.
7. Наследственные пигментные гепатозы.
8. Представление о ксенобиотиках. В чем состоит их опасность для организма человека.
9. Роль печени в биотрансформации ксенобиотиков. НАДН- и НАДФН-зависимые цепи транспорта электронов мембран эндоплазматического ретикулума, цитохромы b5 и P-450.
10. 1-я фаза биотрансформации ксенобиотиков: суть процесса, ферменты, катализирующие реакции этой фазы, и продукты.
11. 2-я фаза биотрансформации ксенобиотиков: суть процесса, ферменты, катализирующие реакции этой фазы, и продукты.
12. Образование в печени липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) и их функции в организме. Роль ЛПОНП в формировании атерогенного потока холестерина в кровяном русле.
13. Образование в печени липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) и их функции в организме. Роль ЛПВП в формировании антиатерогенного потока холестерина в кровяном русле.
14. Биохимические механизмы патогенеза жировой болезни печени при алкоголизме.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. РАССТАВЬТЕ ЦИФРЫ В ПОРЯДКЕ ПОСТУПЛЕНИЯ ХОЛЕСТЕРИНА ИЗ КИШЕЧНИКА В ПЕЧЕНЬ
 - 1) транспорт лимфой
 - 2) действие липопротеинлипазы
 - 3) гидролиз эфира холестерина пищи
 - 4) образование смешанных мицелл
 - 5) всасывание
 - 6) захват печенью остаточных хиломикронов
 - 7) образование остаточных хиломикронов
 - 8) образование хиломикронов

2. СОСТАВЬТЕ СХЕМУ СИНТЕЗА ГЛИКОГЕНА В ПЕЧЕНИ, ИСПОЛЬЗУЯ ПЕРЕЧИСЛЕННЫЕ ФЕРМЕНТЫ
- 1) УДФ-глюкопирофосфорилаза
 - 2) гексокиназа
 - 3) глюкозо-6-фосфатаза
 - 4) фосфоглюкомутаза
 - 5) фосфорилаза активная
 - 6) фермент «ветвления»
 - 7) гликогенсинтетаза
 - 8) протеинкиназа активная
3. ПЕРЕЧИСЛИТЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ СОБЫТИЙ, ПРОТЕКАЮЩИХ В ГЕПАТОЦИТАХ ПОД ВЛИЯНИЕМ ГЛЮКАГОНА
- 1) гликоген→глюкозо-1-фосфат
 - 2) аденилатциклаза неактивная→аденилатциклаза активная
 - 3) глюкагон→рецептор
 - 4) протеинкиназа неактивная→протеинкиназа активная
 - 5) фосфорилаза неактивная→фосфорилаза активная
 - 6) АТФ→цАМФ
4. РАССТАВЬТЕ ЦИФРЫ В ПОРЯДКЕ ПОСТУПЛЕНИЯ ХОЛЕСТЕРИНА ИЗ ПЕЧЕНИ В ПЕРИФЕРИЧЕСКИЕ ТКАНИ
- 1) образование ЛПНП
 - 2) транспорт кровью
 - 3) упаковка в ЛПОНП
 - 4) действие липопротеинлипазы
 - 5) синтез холестерина и его эфиров
 - 6) образование хиломикронов
5. ПЕРЕЧИСЛИТЕ СВОЙСТВА ПРЯМОГО И НЕПРЯМОГО БИЛИРУБИНА, А ТАКЖЕ ИХ ОБЩИЕ СВОЙСТВА
- | | |
|--|---|
| <p>А) прямой билирубин</p> <p>Б) непрямой билирубин</p> <p>В) оба билирубина</p> | <p>1) плохо растворим в воде</p> <p>2) токсичен</p> <p>3) легко выводится из организма</p> <p>4) концентрация увеличивается при гемолитической желтухе</p> <p>5) концентрация увеличивается при обтурационной желтухе</p> <p>6) транспортируется кровью в комплексе с альбуминами</p> <p>7) является связанным с глюкуроновой кислотой</p> <p>8) продукт распада гема</p> |
|--|---|

6. НАЙДИТЕ ПОЛОЖЕНИЯ, СООТВЕТСТВУЮЩИЕ АЭРОБНОМУ ОКИСЛЕНИЮ ЛАКТАТА И ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗУ ИЗ ЛАКТАТА В ПЕЧЕНИ
- | | |
|-----------------------------|--|
| А) глюконеогенез из лактата | 1) снижение в клетке соотношения АТФ/АДФ влияет на скорость процесса |
| Б) окисление лактата | 2) накопление цитрата увеличивает скорость
3) сопровождается синтезом 18 молекул АТФ
4) затрачивается 6 АТФ на активацию процесса
5) накопление НАДН ₂ ингибирует процесс
6) регуляторный фермент пируваткарбоксикиназа |
7. ДЕТОКСИКАЦИЯ ЭТИЛОВОГО СПИРТА В ПЕЧЕНИ ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ СЛЕДУЮЩИМИ ПУТЯМИ
- 1) конъюгацией
 - 2) микросомальным окислением
 - 3) гидролизом
 - 4) немикросомальным окислением
 - 5) митохондриальным окислением
8. БЕЛКИ, СИНТЕЗИРУЕМЫЕ ТОЛЬКО В ПЕЧЕНИ
- 1) альбумины
 - 2) α-глобулины
 - 3) β-глобулины
 - 4) γ-глобулины
 - 5) протромбин
 - 6) фибриноген
9. ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ УПОТРЕБЛЕНИИ АЛКОГОЛЯ ПРОИСХОДЯТ СЛЕДУЮЩИЕ ОТКЛОНЕНИЯ
- 1) накопление НАД⁺ и НАДФ⁺
 - 2) усиление распада гликогена
 - 3) гипогликемия
 - 4) повышение энергетического метаболизма
 - 5) накопление лактата
10. В НЕМИКРОСОМАЛЬНОМ ОКИСЛЕНИИ КСЕНОБИОТИКОВ ПРИНИМАЮТ УЧАСТИЕ СЛЕДУЮЩИЕ ФЕРМЕНТЫ
- 1) НАДН-дегидрогеназа

- 2) НАДФН-цитохром Р450-редуктаза
- 3) моноаминоксидаза
- 4) цитохром с-редуктаза
- 5) пиридинзависимые дегидрогеназы

11. ЭНЕРГОЗАВИСИМЫМИ ЯВЛЯЮТСЯ СЛЕДУЮЩИЕ РЕАКЦИИ КОНЪЮГАЦИИ

- 1) глутатионовая
- 2) глюкуронидная
- 3) пептидная
- 4) сульфатная
- 5) тиосульфатная

12. ПО БИОХИМИЧЕСКОМУ ПРИНЦИПУ КСЕНОБИОТИКИ КЛАССИФИЦИРУЮТСЯ НА

- 1) ингибиторы ферментов
- 2) пищевые вещества
- 3) денатурирующие агенты
- 4) мутагены
- 5) блокаторы функциональных групп белков и коферментов

13. ДЛЯ МИКРОСОМАЛЬНОГО ОБЕЗВРЕЖИВАНИЯ ТОКСИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ ХАРАКТЕРНЫ РЕАКЦИИ

- 1) синтез АТФ
- 2) гидроксилирование
- 3) реакции конъюгации
- 4) трансаминирование

14. В ПРОЦЕССЕ НЕМИКРОСОМАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ КСЕНОБИОТИКОВ ПРИНИМАЮТ УЧАСТИЕ ФЕРМЕНТЫ

- 1) цитохром В5
- 2) алкогольдегидрогеназа
- 3) цитохром Р450
- 4) ксантиноксидаза
- 5) моно- и диаминооксидазы

15. ПУТЕМ МИКРОСОМАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ В ПЕЧЕНИ ПРОИСХОДИТ

- 1) гидроксилирование ксенобиотиков
- 2) синтез холестерина и стероидных гормонов
- 3) окисление ацетальдегида
- 4) синтез ненасыщенных жирных кислот
- 5) гидроксилирование биогенных аминов

16. ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ АЛКОГОЛЯ В ОРГАНИЗМЕ ПРОИСХОДЯТ СЛЕДУЮЩИЕ ОТКЛОНЕНИЯ
- 1) гипергликемия
 - 2) гипогликемия
 - 3) увеличение синтеза АТФ
 - 4) гипознергетическое состояние
 - 5) активация цикла Кори
17. ЦИТОХРОМ P450
- 1) обладает абсолютной специфичностью, так как действует только на определенные субстраты
 - 2) мало специфичен, так как действует на большинство гидрофобных субстратов
 - 3) принимает протоны и электроны от любых субстратов
 - 4) аутооксидабельный
 - 5) не обладает аутооксидабельностью
18. В ПЕЧЕНИ ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТ ВЫПОЛНЯЕТ СЛЕДУЮЩИЕ ФУНКЦИИ
- 1) инициирует глюконеогенез
 - 2) является субстратом для пентозного пути окисления
 - 3) активирует фосфоролиз гликогена
 - 4) ингибирует глюкокиназу
 - 5) участвует в синтезе гликогена
19. ВЫБЕРИТЕ РЕАКЦИИ СИНТЕЗА ЛИПИДОВ, ПРОТЕКАЮЩИЕ ТОЛЬКО В ПЕЧЕНИ
- 1) синтез ЛПНП
 - 2) синтез хиломикрон
 - 3) синтез кетоновых тел
 - 4) окисление кетоновых тел
 - 5) синтез холестерина
20. В ПЕЧЕНИ НАДФН ИСПОЛЬЗУЕТСЯ ДЛЯ СИНТЕЗА
- 1) глюкозы
 - 2) ацетоацетата
 - 3) жирных кислот
 - 4) глутамина
 - 5) мевалоновой кислоты
21. В ПЕЧЕНИ ПРОТЕКАЮТ РЕАКЦИИ МЕТАБОЛИЗМА ЛИПИДОВ
- 1) синтез и окисление жирных кислот
 - 2) синтез и окисление кетоновых тел
 - 3) образование ЛПОНП и ЛПНП

- 4) синтез фосфатидов
- 5) обмен холестерина

22. НАЙДИТЕ ОТЛИЧИЯ ОБМЕНА ГЛИКОГЕНА В ПЕЧЕНИ ОТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЕГО МЫШЦАМИ

- 1) в печени отсутствует глюкозо-6-фосфатаза
- 2) гликоген печени используется только на нужды печени
- 3) в мышцах идет цикл Кори, а в печени нет
- 4) гликоген печени используется на нужды всего организма

23. ВЫБЕРИТЕ ФЕРМЕНТЫ, ПРОЯВЛЯЮЩИЕ НАИБОЛЬШУЮ АКТИВНОСТЬ В ПЕЧЕНИ

- 1) креатинфосфокиназа ММ и МВ
- 2) ЛДГ-1 и ЛДГ-2
- 3) аланинаминотрансфераза
- 4) аспартатаминотрансфераза
- 5) глюкозооксидаза

24. ПРИ ОБТУРАЦИОННОЙ ЖЕЛТУХЕ

- 1) нарушен процесс желчевыделения
- 2) нарушен процесс транспорта непрямого билирубина
- 3) в крови увеличен прямой и непрямой билирубин
- 4) нарушен процесс конъюгации с глюкуроновой кислотой
- 5) в кале отсутствует стеркобилиноген

25. НОРМАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПИГМЕНТНОГО ОБМЕНА

- 1) в крови содержится 75% непрямого и 25% прямого билирубина
- 2) в моче содержится билирубин
- 3) в моче содержится стеркобилиноген
- 4) в кале отсутствуют желчные пигменты

26. ПРИ ПАРЕНХИМАТОЗНОЙ ЖЕЛТУХЕ

- 1) нарушена экскреция прямого билирубина в желчные капилляры
- 2) усилен гемолиз эритроцитов
- 3) в крови и моче появляется уробилиноген
- 4) в кале увеличивается количество стеркобилиногена
- 5) нарушена активность УДФ-глюкуронил-трансферазы

27. НЕПРЯМОЙ БИЛИРУБИН

- 1) связан с глюкуроновой кислотой
- 2) конъюгированный билирубин
- 3) адсорбирован на белках сыворотки крови
- 4) ковалентно связан с альбуминами сыворотки крови
- 5) не обладает токсичностью

28. ПРИ ПОЛНОМ УДАЛЕНИИ ПЕЧЕНИ, КОНЦЕНТРАЦИЯ КАКИХ ИЗ ПЕРЕЧИСЛЕННЫХ ВЕЩЕСТВ В КРОВИ УМЕНЬШАЕТСЯ

- 1) аммиак
- 2) ЛПОНП
- 3) креатин
- 4) индикан
- 5) альбумины

29. ПРЯМОЙ БИЛИРУБИН

- 1) транспортируется альбуминами крови
- 2) конъюгированный билирубин
- 3) связан с глюкуроновой кислотой
- 4) связан в печени с желчными кислотами
- 5) дает цветную реакцию с диазореактивом Эрлиха

30. ЧТО НАБЛЮДАЕТСЯ ПРИ АКТИВАЦИИ ГЛЮКУРОНИЛТРАНСФЕРАЗЫ В ГЕПАТОЦИТАХ

- 1) происходит уменьшение количества прямого билирубина в крови
- 2) происходит увеличение количества прямого билирубина в крови
- 3) происходит увеличение количества непрямого билирубина в крови
- 4) не изменяется соотношение прямого и непрямого билирубина в крови

31. ПРИ ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ ЖЕЛТУХЕ

- 1) происходит усиленный распад гемоглобина
- 2) в крови увеличено содержание прямого билирубина
- 3) в моче появляется билирубин
- 4) в крови резко увеличен непрямой билирубин
- 5) в моче отсутствует билирубин
- 6) кал обесцвечен

32. ВЫБЕРИТЕ КОНЕЧНЫЙ ПРОДУКТ ПРЕОБРАЗОВАНИЯ БИЛИРУБИНА В ПЕЧЕНИ

- 1) уробилиноген
- 2) ди- и трипирролы
- 3) стеркобилиноген
- 4) желчные пигменты
- 5) моноглюкурониды билирубина

БИОХИМИЯ МЫШЦ

Тема 2.1. ИСТОЧНИКИ ЭНЕРГИИ ДЛЯ МЫШЕЧНОГО СОКРАЩЕНИЯ

Актуальность

Мышцы в комплексе с костным скелетом образуют опорно-двигательный аппарат организма. Они активная часть этого аппарата: мышечное сокращение происходит под действием нервных импульсов, доставляемых к мышечным волокнам по отросткам мотонейронов. Основная функция мышц – сократительная. При сокращении мышц совершается работа, связанная с трансформацией химической энергии в механическую.

Особенность метаболизма мышечной ткани состоит в том, что даже в условиях относительного физического покоя её обмен протекает на довольно значительном уровне. При усилении мышечной активности скорость метаболизма возрастает в десятки раз. В этих условиях создаются неблагоприятные условия для работы мышц: происходят сдавливания и изгибы сосудов, что затрудняет кровоток, а, следовательно, ухудшает поступление кислорода, приводя к гипоксии мышц.

В скелетных мышцах человека реализуются следующие механизмы синтеза АТФ:

1. Анаэробные механизмы:

- креатинфосфатный механизм обеспечивает срочный, но кратковременный ресинтез АТФ за счет перефосфорилирования между креатинфосфатом и АДФ;

- гликолитический (лактатный) механизм обеспечивает ресинтез АТФ в процессе анаэробного окисления глюкозы (так называемый, «анаэробный гликолиз»). Глюкоза поступает в миоциты из крови, либо в результате расщепления запасов мышечного гликогена. Процесс завершается образованием молочной кислоты (лактата);

- миокиназный механизм, обеспечивающий ресинтез АТФ за счёт реакции перефосфорилирования между двумя молекулами АДФ, катализируемой миокиназой (аденилаткиназой). Фермент присутствует только в мышцах:



2. Аэробный механизм синтеза АТФ обеспечивается окислительным фосфорилированием, протекающим в митохондриях. Субстратами окисления служат глюкоза, длинноцепочечные жирные кислоты (ДЦЖК), лактат, кетоновые тела, а также, частично, аминокислоты.

В зависимости от продолжительности мышечной работы вышеперечисленные механизмы синтеза АТФ включаются в определенной последовательности, сменяя друг друга. Экстренным является креатинкиназный механизм, и лишь примерно через 20 с от начала интенсивной мышечной работы к процессу энергообеспечения «подключается» гликолиз. Его активность достигает максимума через 40–60 с. При этом темпы снабжения мышц кислородом начинают отставать от потребности в нём – мышца вынуждена использовать гликолитический (анаэробный) путь синтеза АТФ. В этих условиях скорость окисления глюкозы с образованием лактата увеличивается в сотни раз. Если требуется продолжать мышечную работу, то есть, когда мышцы вынуждены выполнять сокращения в течение длительного времени, основным источником АТФ становятся реакции окислительного фосфорилирования. При этом ведущим субстратом окисления становятся ДЦЖК. Запас собственного гликогена в миоцитах к этому времени уже исчерпан. Успевший накопиться лактат выходит из мышц в кровь и поглощается печенью, где превращается в глюкозу (глюконеогенез). Таким образом, энергетическое обеспечение мышц при разных режимах их работы существенно отличаются.

2.1.1. Выделение миозина из скелетных мышц животных

Миозин – основной сократительный фибриллярный белок мышц с молекулярной массой 470 000. Миозин способен образовывать комплексы с молекулами АДФ и АТФ (что позволяет «отбирать» энергию у АТФ), а также с белком – актином, что обеспечивает мышечное сокращение.

Миозин образуют две одинаковые длинные полипептидные α -цепи, закрученные как двойная спираль. Важный вклад в функциональность миозина вносят протеолитические ферменты, с помощью которых миозин распадается на две части. Одна часть связывается, посредством спаек с актином, образуя актомиозин. Именно эта часть обеспечивает аденозинтрифосфатазную активность, которая зависит от рН среды, оптимум рН 6,0–9,5, а также концентрации КСl. Актомиозин в присутствии АТФ распадается, но в отсутствии свободной АТФ он стабилен. Вторая часть молекулы миозина тоже состоит из двух перекрученных спиралей, за счет электростатического заряда они связывают молекулы миозина в протофибриллы.

Молекула миозина отрицательно заряжена, поэтому специфически взаимодействует с ионами Ca^{2+} и Mg^{2+} . Именно поэтому миозин в присутствии ионов Ca^{2+} ускоряет гидролиз АТФ, таким образом проявляется ферментативная аденозинтрифосфатная активность.



Принцип

Методы выделения миозина основаны на различной растворимости миозина и актомиозина и сводятся к многократному, последовательному осаждению и растворению миозина в растворах хлористого калия различной ионной силы.

Миозин и продукт его взаимодействия с актином – актомиозин растворимы при ионной силе раствора, превышающей 0,3, и значении рН ближе к 7,0. Причем растворимость миозина, а следовательно скорость и полнота его экстракции из гомогената мышц, заметно больше, чем у актомиозина. Используя растворы с ионной силой 0,5 и сократив время экстракции до 15–20 мин, можно извлечь миозин из гомогената практически селективно, то есть с малыми примесями актомиозина. От следов актомиозина в экстракте можно избавиться почти полностью, понизив разведением ионную силу экстракта до величин, близких к 0,3, поскольку растворимость актомиозина при этой силе мала по сравнению с растворимостью миозина.

Реактивы:

1. Свежеприготовленный раствор Бейли: 0,03 М р-р NaHCO_3 на 0,5 М р-ре KCl .
2. Калий хлористый, 0,5 М ($M_m=74,5$).

Проведение анализа

Получение экстракта:

Мышечную ткань в количестве 2 г измельчают на льду ножницами и гомогенизируют 30–40 с с одним объемом реактива Бейли (2 г принимаем за 1 объем, что будет соответствовать 2 мл раствора Бейли). К гомогенату добавляют еще 2 объема (4 мл) раствора Бейли и оставляют на холоде на 15–20 мин, время от времени помешивая стеклянной палочкой. Для осуществления последующих этапов методики следует вычислить конечную концентрацию KCl , которая будет достигнута в полученной смеси гомогената и реактива Бейли.

Осаждение миозина:

Измерить объем в пробирке. Смесь гомогената и реактива Бейли центрифугируют при охлаждении в течении 15–20 мин при 8000 об./мин. Центрифугат фильтруют через двойной слой марли для удаления жира, измеряют объем полученного фильтрата и разводят его бидистиллированной водой так, чтобы конечная концентрация KCl с учетом объема мышечной массы составила 0,25 моль/л. Для расчета объема бидистил-

лированной воды, который потребуется для достижения указанной концентрации KCl, можно использовать уравнение:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_x,$$

где:

C_1 – концентрация KCl в фильтрате (0,5 моль/л); V_1 – объем фильтрата (4 мл); C_2 – концентрация KCl, которую требуется получить (0,25 моль/л); V_x – объем бидистиллированной воды.

Тогда,

$$V_x = (C_1 \times V_1) / C_2$$

Фактический объем бидистиллированной воды, который следует добавить к смеси для получения требуемой концентрации KCl (ΔV), вычисляют по формуле:

$$\Delta V = V_1 - V_x$$

Воду следует добавлять медленно при непрерывном помешивании. Если актомиозин сразу не выпадает в осадок, то раствор следует оставить на холоде на 0,5–2,0 ч.

Образовавшуюся желатинообразную массу энергично встряхивают и центрифугируют при 8 000 об./мин в течение 15–20 мин. Осадок актомиозина отбрасывают.

Очистка миозина:

Измеряют объем полученного центрифугата и разводят бидистиллированной водой до конечной концентрации KCl 0,04 и снова измеряют объем полученной смеси, затем оставляют на 1 час на льду. Если осадок не выпадает, можно оставить на ночь в холодильнике. Затем центрифугируют при 2500 об./мин в течение 20 мин. Осадок миозина переносят стеклянной палочкой в мерную пробирку для определения его объема и растворяют его добавлением кристаллического KCl до конечной концентрации 0,5 М (добавляют к осадку 1 мл воды).

Переосаждение миозина:

Раствор миозина разводят водой до конечной концентрации 0,04 моль/л, осторожно перемешивают и центрифугируют при 2 000 об./мин в течение 20 мин. Осадок растворяют, добавляя кристаллический KCl. Раствор миозина хранят при 0 °С в плотно закрытых флаконах с возможно меньшим воздушным пространством над раствором.

В растворе миозина проводится определение содержания белка одним из колориметрических методов, определяется АТФ-азная ферментативная активность и число сульфгидрильных групп методом амперо-

метрического титрования или титрования с парахлормеркурибензоатом (ПХМБ).

2.1.2. Определение АТФ-азной активности миозина

АТФ-азная активность впервые была открыта у миозина В.А. Энгельгардтом и М.Н. Любимовой в 1939 г. АТФ-азная активность – это способность гидролизовать АТФ до АДФ. АТФ-азная активность и способность взаимодействовать с актином главные свойства глобулярных головок миозина.

АТФ-азная активность миозина проявляется только в присутствии определенных катионов. *In vitro* АТФ-азная активность сильно проявляется в присутствии ионов Ca^{2+} (Ca^{2+} -АТФ-азная активность) и очень слабо – ионами Mg^{2+} . Однако Mg^{2+} -АТФ-азная активность миозина резко возрастает при взаимодействии миозина с актином – актинактивируемая Mg^{2+} -АТФ-азная активность миозина. Эта активность и имеет место в живой мышце, где в физиологических условиях концентрация Mg^{2+} высока. В процессе Mg^{2+} -АТФ-азной реакции миозиновая головка подвергается глобальной конформационной перестройке, сопровождающейся полным изменением доменной структуры.

Принцип метода

Определение количества неорганического фосфата, образующегося при расщеплении молекулы АТФ под действием миозина в присутствии ионов Ca^{2+} .

Реактивы:

1. 0,1 М р-р КСl.
2. 0,05 М трис-НСl буфер (рН 7,6), приготовленный на 0,1 М КСl.
3. 0,1 М CaCl_2 .
4. 0,05 М р-р АТФ (Мм=551,15).
5. 10% р-р ТХУ.
6. Биуретовый реактив.
7. Молибденовый реактив.
8. 1% р-р аскорбата (*ex tempore* на 0,1 М р-ре НСl).

Проведение анализа

В двух пробирках к 1,0 мл буфера добавляют 0,2 мл раствора 0,1 М CaCl_2 , 0,3 мл раствора АТФ, 0,3 мл дистиллированной воды и оставляют на 5 мин на водяной бане при 26 °С. Затем в контрольную пробу добавляют 1,0 мл холодной 10% ТХУ. Далее в обе пробы добавляют 0,2 мл раствора миозина, содержащего 2–3 мг белка (содержание белка предварительно определяют биуретовым методом, с использованием калибровочной кривой), перемешивают и инкубируют на водяной бане при 26 °С в течение 30 мин. Реакцию в опытной пробе останавливают до-

бавлением 1,0 мл холодного 10% раствора ТХУ. Пробы центрифугируют при 3000 об./мин в течение 10 мин.

Далее в супернатанте опытной пробы определяют содержание неорганического фосфора, получившегося в результате ферментативного расщепления АТФ, а в контрольной пробе – количество предобразованного фосфата. Для чего переносят по 1,5 мл супернатанта в химические пробирки, в обе пробы добавляют по 1,0 мл 1% раствора аскорбиновой кислоты и по 1,0 мл молибденового реактива. Все пробы одновременно инкубируют 10 мин при комнатной температуре и сразу же измеряют их оптическую плотность при длине волны 640 нм против контроля на реактивы.

Количество неорганического фосфора определяют с помощью калибровочной кривой (рис. 2). По разности контрольной и опытной проб рассчитывают количество фосфата (в мкг), образовавшегося в результате ферментативного расщепления АТФ.

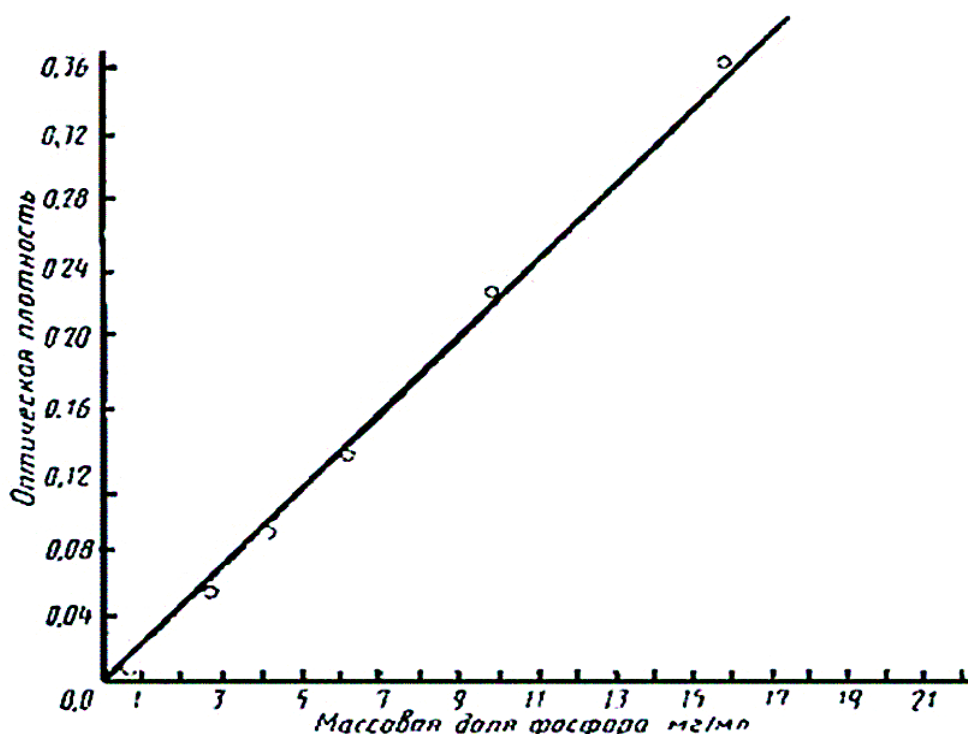


Рис. 2. Калибровочный график для определения неорганического фосфата

Далее, учитывая молекулярную массу фосфора, результат пересчитывают на мкМ фосфора/мг белка.

СЕМИНАР **«Энергетический обмен в мышечных тканях»**

1. Характеристика трёх типов мышц: скелетные, сердечные и гладкие мышцы: локализация, выполняемые функции и управляемость сознанием.

2. Анатомо-морфологические основы особенностей миокарда: узлы синоатриальный (узел Кис-Флака) и атриовентрикулярный (узел Ашоф–Тавара), пучок и ножки Гиса, волокна Пуркинье. Роль вставочных дисков.
3. Общая характеристика структуры скелетных мышц: мышечные волокна, сарколемма и миофибриллы, толстые филаменты (миозин) и тонкие филаменты (актин).
4. Молекулярная структура толстых (миозиновых) филаментов.
5. Молекулярная структура тонких (актиновых) филаментов.
6. Структура саркомера как повторяющегося элемента поперечно-полосатой миофибриллы. Роль белка титина.
7. Биохимический механизм трансформации нервного импульса, доставляемого по двигательному нейрону, в потенциал действия сарколеммы миоцита. Функция концевой пластинки (нервно-мышечного соединения).
8. Механизм сопряжения потенциала действия сарколеммы и состоянием мембраны саркоплазматического ретикулума: взаимодействие дигидропиридиновых и рианодиновых рецепторов.
9. Суть модели скользящих филаментов, объясняющей функционирование цикла сокращения – расслабления мышцы.
10. Конкретные роли АТФ и ионов Ca^{2+} в реализации явлений, лежащих в основе модели скользящих филаментов.
11. Биохимический механизм трупного окоченения.
12. Биоэнергетика скелетных мышц: «быстрые» и «медленные» мышечные волокна.
13. Биохимический механизм развития утомления скелетных мышц.
14. Особенности биоэнергетики миокарда.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. ПРОСЛЕДИТЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ УЧАСТИЯ ИОНОВ Ca^{2+} В ПРОЦЕССЕ МЫШЕЧНОГО СОКРАЩЕНИЯ
 - 1) кальций связывается с С-субъединицей тропонина и вызывает конформационные изменения в структуре тропомиозина
 - 2) Ca^{2+} -АТФ-аза транспортирует ионы кальция из саркоплазматического ретикулума
 - 3) нервный импульс вызывает высвобождение Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума
 - 4) взаимодействие головки миозина с актином
 - 5) удаление Ca^{2+} в цистерны саркоплазматического ретикулума

2. УКАЖИТЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ЭТАПОВ МЫШЕЧНОГО СОКРАЩЕНИЯ
- 1) происходит скольжение нитей актина вдоль нитей миозина
 - 2) происходит контакт головки миозина с актином
 - 3) происходит гидролиз АТФ и выделение энергии
 - 4) проявляется АТФ-азная активность головки миозина
 - 5) актин связан с миозином
3. ВЫБЕРИТЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ЭТАПОВ, ПРОИСХОДЯЩИХ В МЫШЦЕ В СТАДИИ РАССЛАБЛЕНИЯ
- 1) миозиновая головка в присутствии АТФ отделяется от F-актина, вызывая расслабление
 - 2) комплекс ТnC-4Ca²⁺ диссоциирует
 - 3) содержание Ca²⁺ в цитоплазме падает вследствие его поглощения саркоплазматическим ретикулумом
 - 4) тропонин, реагируя с тропомиозином, ингибирует дальнейшие взаимодействия миозиновой головки с F-актином
4. ВЫБЕРИТЕ ФЕРМЕНТЫ, ПРОЯВЛЯЮЩИЕ НАИБОЛЬШУЮ АКТИВНОСТЬ
- | | |
|---------------------------------------|--|
| А) в скелетных мышцах | 1) аспартатаминотрансфераза и изоферменты ЛДГ1 и ЛДГ2 |
| Б) в миокарде | 2) аспартатаминотрансфераза и изоферменты ЛДГ4 и ЛДГ5 |
| В) ни в одной из перечисленных тканей | 3) изоформы креатинкиназы MB и BB
4) изофермент креатинкиназа MB и аспартатаминотрансфераза
5) изоферменты ЛДГ1 и ЛДГ2
и Изоформа креатинкиназы MM и ЛДГ4 и ЛДГ5
6) аспартат- и аланинаминотрансферазы
7) изоферменты ЛДГ4 и ЛДГ5 |
5. КАКИЕ ИЗ СЛЕДУЮЩИХ УТВЕРЖДЕНИЙ ХАРАКТЕРИЗУЮТ БЕЛКИ ТРОПОНИН (А) И ТРОПОМИОЗИН (Б)?
- 1) глобулярный белок
 - 2) состоит из 7 глобул
 - 3) связан с миозином
 - 4) фибриллярный белок
 - 5) по длине соответствует 7 глобулам актина
 - 6) состоит из 3-х субъединиц
 - 7) присоединяет Ca²⁺
 - 8) закрывает участок актина для взаимодействия с миозином

6. УКАЖИТЕ ОСОБЕННОСТИ, ХАРАКТЕРНЫЕ ДЛЯ

- | | |
|--------------------|--|
| А) миокарда | 1) тропонин имеет три центра связывания ионов кальция. |
| Б) скелетной мышцы | 2) ресинтез АТФ идет преимущественно за счет окислительного фосфорилирования |
| | 3) основным субстратом окисления является глюкоза |
| | 4) ресинтез АТФ идет, в основном, за счет гликолиза |
| | 5) тропонин имеет четыре центра связывания Ca^{2+} |
| | 6) Ca^{2+} -АТФ-аза имеет наибольшее сродство к ионам кальция и быстрее снижает его концентрацию |
| | 7) основным субстратом окисления являются жирные кислоты и кетоновые тела |

7. ВЫБЕРИТЕ ПОЛОЖЕНИЯ, СООТВЕТСТВУЮЩИЕ

- | | |
|------------------------------|---|
| А) состоянию покоя мышцы | 1) комплекс $TnC-4Ca^{2+}$ утрачивает кальций |
| Б) процессу сокращения мышцы | 2) в головке миозина идет гидролиз АТФ |
| В) ни одному из них | 3) тропонин, реагируя с тропомиозином, ингибирует взаимодействие миозина с актином |
| | 4) актин меняет свою длину относительно миозина |
| | 5) скольжение тонких нитей относительно тонких |
| | 6) головка миозина связана с актином. тропомиозин связан с контактным участком актина |
| | 7) актин и миозин изменяют свою длину |
| | 8) головка миозина поворачивается на 180° |

8. В СОСТАВ МИОЗИНА ВХОДЯТ

- 1) две основные тяжелые нити и четыре легких цепи
- 2) нити легкого меромиозина, обладающие АТФ-азной активностью
- 3) головка, обладающая АТФ-азной активностью
- 4) тяжелые нити, обладающие АТФ-азной активностью

9. ДЛЯ АКТИНА ХАРАКТЕРНО

- 1) наличие двух форм: глобулярной и фибриллярной

- 2) образование комплекса с миозином в присутствии АДФ
- 3) образование комплекса с тропомиозином
- 4) способность к гидролизу АТФ
- 5) отсутствие АТФ-азной активности

10. СВОЙСТВА МИОЗИНА

- 1) спонтанно образовывать волокна при физиологических значениях рН
- 2) ферментативная активность
- 3) связывает полимеризованную форму актина
- 4) спонтанно образовывать связь с тропомиозином
- 5) при мышечном сокращении тонкие нити миозина могут изменять свою толщину и скользить вдоль нитей актина

11. ТРОПОМИОЗИН – ЭТО

- 1) глобулярный белок
- 2) фибриллярный белок
- 3) белок, связывающийся с актином, закрывая центр связывания с головкой миозина
- 4) белок, активирующий АТФ-азную активность миозина
- 5) белок, связывающий 7 глобул актина

12. АКТИН ИМЕЕТ В СВОЕМ СОСТАВЕ И ХАРАКТЕРИЗУЕТСЯ

- 1) F-актин, спираль из мономеров актина
- 2) G-актин, спираль из мономеров актина
- 3) актин, участвующий в мышечном сокращении, так как обладает АТФ-азной активностью
- 4) АТФ-азная активность миозина значительно возрастает в присутствии стехиометрических количеств F-актина

13. ГЛОБУЛЯРНЫЙ АКТИН ОБЛАДАЕТ СЛЕДУЮЩИМИ ОСОБЕННОСТЯМИ

- 1) состоит из 7 глобул, закручивающихся между собой
- 2) образует нити фибриллярного актина
- 3) каждая глобула имеет центр связывания с миозином
- 4) связывается с миозином в участке перекручивания 2-х глобулярных цепей
- 5) каждая глобула обладает АТФ-азной активностью

14. ТРОПОМИОЗИН ВЫПОЛНЯЕТ СЛЕДУЮЩИЕ ФУНКЦИИ

- 1) блокирует связь между актином и миозином
- 2) способствует удалению ионов кальция
- 3) блокирует связь между ингибиторной субъединицей тропониона и контактными участками актина
- 4) ингибирует гидролиз АТФ

15. СРЕДИ ФУНКЦИЙ ТРОПОНИНА И ТРОПОМИОЗИНА МОЖНО ВЫДЕЛИТЬ СЛЕДУЮЩИЕ

- 1) тропонин и тропомиозин активируют связывание актина и миозина
- 2) в отсутствие Ca^{2+} тропонин и тропомиозин ингибируют взаимодействие актина и миозина
- 3) гидролиз АТФ активирует влияние регуляторных белков тропонина и тропомиозина на образование актомиозинового комплекса
- 4) высвобождение Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума приводит к блокированию тропомиозином актина к головкам миозина

16. РОЛЬ Ca^{2+} В МЫШЕЧНОМ СОКРАЩЕНИИ

- 1) ионы Ca^{2+} запускают мышечное сокращение, присоединяясь к тропомиозину
- 2) ионы Ca^{2+} связываются с ТnC – компонентом тропонина, что вызывает конформационные сдвиги
- 3) Ca^{2+} регулирует мышечное сокращение по аллостерическому механизму со следующей последовательностью передачи информации: $\text{Ca}^{2+} \rightarrow$ тропомиозин \rightarrow актин \rightarrow миозин
- 4) в отсутствие Ca^{2+} тропонин и тропомиозин ингибируют взаимодействие актина и миозина

17. РЕГУЛЯЦИЯ ПОТОКА ИОНОВ Ca^{2+} САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКИМ РЕТИКУЛУМОМ ПРОИСХОДИТ СЛЕДУЮЩИМ ОБРАЗОМ

- 1) в состоянии покоя система активного транспорта Ca^{2+} накапливает его в саркоплазматическом ретикулуме
- 2) кальциевый насос, приводимый в действие АТФ, увеличивает концентрацию Ca^{2+} в цитоплазме покоящейся мышцы
- 3) деполяризация мембран Т-микротрубочек вызывает выброс Ca^{2+} из цистерн саркоплазматического ретикулума
- 4) нервный импульс, приводящий к деполяризации мембран, вызывает перекачивание Ca^{2+} в цистерны саркоплазматического ретикулума

18. МЫШЕЧНОЕ СОКРАЩЕНИЕ ОБЕСПЕЧИВАЕТСЯ

- 1) тем количеством АТФ, которое имеется в мышце и может поддержать сократительную активность всего лишь на протяжении доли секунды
- 2) тем количеством АТФ, которое имеется в мышце для поддержания сократительной активности на длительное время
- 3) запасом богатых энергией фосфатных связей в виде фосфокреатина

4) так как в работающей мышце возрастает концентрация АДФ и Фн, то они полностью обеспечивают энергией мышечное сокращение

19. РОЛЬ АТФ ПРИ МЫШЕЧНОМ СОКРАЩЕНИИ ЗАКЛЮЧАЕТСЯ В СЛЕДУЮЩЕМ

- 1) активация мышечного сокращения
- 2) регуляция функции тропонина
- 3) активация аденилатциклазной реакции
- 4) активация Ca^{2+} -АТФ-азы
- 5) обеспечение реполяризации мембраны

20. ПУТИ РЕСИНТЕЗА АТФ СЛЕДУЮЩИЕ

- 1) за счет энергии креатинфосфата
- 2) в процессе окислительного фосфорилирования в дыхательной цепи внутренней мембраны митохондрий
- 3) в дыхательной цепи наружной мембраны митохондрий
- 4) при распаде креатинфосфата с образованием креатинина
- 5) в аденилатциклазной реакции

21. ГИДРОЛИЗ АТФ

- 1) запускает мышечное сокращение
- 2) запускает цикл ассоциации и диссоциации актина и миозина
- 3) активирует тропониновую систему
- 4) вызывает стадию расслабления мышечного сокращения
- 5) вызывает конформационные изменения в головках миозина

22. В ПРОЦЕССЕ СОКРАЩЕНИЯ ПРОИСХОДИТ

- 1) сокращение актина и миозина
- 2) скольжение тонких нитей относительно толстых нитей
- 3) актин меняет свою длину относительно миозина
- 4) миозин меняет свою длину относительно актина
- 5) актин и миозин не меняют своей длины

23. МЕХАНИЗМ ЗАПУСКА МЫШЕЧНОГО СОКРАЩЕНИЯ ПРОИСХОДИТ

- 1) за счет энергии АТФ, которая обеспечивает эффект «гребка» весельной лодки
- 2) за счет ионов Ca^{2+}
- 3) за счет энергии креатинфосфата

24. СЕРДЦЕ «БОРЕТСЯ» ЗА ДИАСТОЛУ, ПОЭТОМУ ДЛЯ МИОКАРДА ХАРАКТЕРНО

- 1) наибольшее сродство к ионам кальция
- 2) сродство к ионам кальция ниже, чем в скелетной мышце
- 3) высокая активность Ca^{2+} -АТФ-азы
- 4) низкая активность Ca^{2+} -АТФ-азы

БИОХИМИЯ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

Тема 3.1. БИОХИМИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА

Актуальность

Соединительная ткань – сложная структура, в состав которой входят клетки мезенхимального происхождения и аморфный матрикс. Являясь своеобразным «структурным каркасом» организма, соединительная ткань связывает между собой клетки, покрывает снаружи все органы, составляет основу опорно-двигательного аппарата.

Особенностью строения соединительной ткани является тот факт, что внеклеточный матрикс существенно преобладает над содержанием клеток. Внеклеточный матрикс представлен фибриллярными и нефибриллярными белками, погруженными в полисахаридный гель. Клеточный состав соединительной ткани включает фибробласты и их разновидности (остеобласты, хондробласты, кератобласты и т.д.), а также макрофаги, тучные и плазматические клетки. Макрофаги играют существенную роль в развитии неспецифической реакции воспаления. Фибробласты, хондробласты контролируют репаративные процессы, заживление ран, образование рубца. Изучение особенностей метаболизма соединительной ткани в норме и патологии представляет интерес для врачей многих специальностей.

3.1.1. Выделение коллагена из сухожилий животных

Коллаген получают из сухожилий животного. Для этого производят следующие операции:

- удаляют оболочки сухожилий;
- измельчают материал;
- промывают измельченный материал физиологическим фосфатным буфером (PBS) (2 г хлористого калия KCl, 2 г однозамещенного фосфорнокислого калия KH_2PO_4 , 80 г хлористого натрия и 79,3 г двузамещенного фосфата натрия на 1 л раствора), pH 6,5–8,5, разбавленным 1:3–1:1; наиболее эффективен разбавленный 1: 3 PBS с ионной силой 0,05 М (0,05 молярного) NaCl и 0,0022 М Na_2HPO_4 (6-кратная промывка по 2 ч);
- экстрагируют коллаген слабой кислотой (0,5–2 М уксусная кислота); предпочтительно 0,5 М уксусная кислота с добавкой 4 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА);

- осаждают коллаген с помощью NaCl (0,6–1,8 М);
- выделяют осадок и растворяют его в уксусной кислоте;
- переводят раствор диализом в 0,01 М уксусную кислоту.

3.1.2. Определение гидроксипролина

Определение фракций гидроксипролина основано на том, что гидроксипролин подвергают окислению хлорамином Б, а затем продукты его окисления конденсируют пара-диметиламинобензальдегидом, при этом образуется красного цвета хромоген.

Определение общего гидроксипролина в сыворотке крови: В стеклянных пробирках с плотно притертыми пробками к 0,4 мл сыворотки крови добавляют 1,5 мл 8 Н хлорной кислоты (HClO₄), гидролизуют 4 ч на водяной бане при температуре 100 °С. Затем переносят содержимое пробирок в центрифужные пробирки, нейтрализуют 8 М раствором гидроксида натрия (NaOH) до pH=6,0 с использованием универсальных индикаторных полосок. Объем пробы доводят до 4,0 мл. Добавляют 0,25 г активированного угля и кипятят 5 мин на водяной бане. Охлаждают, центрифугируют при 2000 об/мин 15 мин 0,3 мл надосадочной жидкости переносят в пробирки и далее определяют гидроксипролин.

Для этого к пробам приливают 0,4 мл изопропанола, 0,2 мл окислительного раствора (7% раствор хлорамина Б и ацетат-цитратный буфер (57 г трехзамещенного ацетата натрия 3-водного, 37,5 г трехзамещенного цитрата натрия 2-водного, 5,5 г лимонной кислоты 1-водн., 385 мл изопропанола доведенного дистиллированной водой до 1 л) в соотношении 1:4) и оставляют на 5 мин при комнатной температуре (17–21 °С), предварительно тщательно перемешав.

К смеси добавляют 2,5 мл реактива Эрлиха (смесь пара-диметиламинобензальдегида, растворенного в 57% перхлорной кислоте в соотношении 10 г альдегида: 12 мл кислоты, и изопропанола), тщательно перемешивают и выдерживают при 60 °С 30 мин. Пробирки охлаждают, измеряют оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 575 нм.

Содержание общего гидроксипролина определяют по формуле:

$$\text{Соб.} = (\text{Сст.} \times \text{Епр.} / \text{Ест.}) \times 10 \text{ ммоль/л} ,$$

где:

Соб. – концентрация общего гидроксипролина в пробе (ммоль/л);
 Сст. – концентрация гидроксипролина в стандартной пробе (ммоль/л);
 Епр. – оптическая плотность опытной пробы; Ест. – оптическая плотность стандартного раствора гидроксипролина.

Содержание общего гидроксипролина в пробе выражают в ммоль/л.

Определение суммарного (свободный и пептидный) гидроксипролина: 0,5 мл сыворотки крови в центрифужных пробирках добавляют 2,0 мл этанола и тщательно перемешивают, выдерживают 15 мин, затем

центрифугируют при 2000 об./мин в течение 20 мин. Супернатант делят на 2 части: 0,9 мл на определение суммарного содержания свободного и пептидного гидроксипролина и 1,0 мл – на определение свободного гидроксипролина. К 0,9 мл надосадка добавляют 1,5 мл 8 Н хлорной кислоты (HClO₄), гидролизуют 4 часа на водяной бане при температуре 100 °С. 0,3 мл надосадочной жидкости переносят в пробирки и далее определяют в пробах гидроксипролин вышеописанным методом. Содержание суммарного гидроксипролина определяли по формуле:

$$\text{Ссм.}=(\text{Сст.}\cdot\text{Епр.}/\text{Ест.})\cdot 16 \text{ [ммоль/л] ,}$$

где:

Ссм. – концентрация суммарного гидроксипролина в пробе (ммоль/л); Сст. – концентрация гидроксипролина в стандартной пробе (ммоль/л); Епр. – оптическая плотность опытной пробы; Ест. – оптическая плотность стандартного раствора гидроксипролина. Содержание суммарного гидроксипролина в пробе выражают в ммоль/л.

Для определения *свободного гидроксипролина* в сыворотке крови в 1,0 мл супернатанта полученного, как описано выше проводят определение содержания гидроксипролина вышеописанным методом. Содержание свободного гидроксипролина определяют по формуле:

$$\text{Ссв.}=(\text{Сст.}\cdot\text{Епр.}/\text{Ест.})\cdot 4 \text{ [ммоль/л] ,}$$

где:

Ссв. – концентрация общего гидроксипролина в пробе (ммоль/л); Сст. – концентрация гидроксипролина в стандартной пробе (ммоль/л); Епр. – оптическая плотность опытной пробы; Ест. – оптическая плотность стандартного раствора гидроксипролина. Содержание свободного гидроксипролина в пробе выражают в ммоль/л.

Содержание белковой и пептидной фракций гидроксипролина рассчитывают по формулам:

$$\begin{aligned} \text{белковый: } \text{Сб.} &= \text{Соб.} - \text{Ссм.} \\ \text{пептидный: } \text{Сп.} &= \text{Ссм.} - \text{Ссв.} \end{aligned}$$

где:

Сб. – концентрация белкового гидроксипролина (ммоль/л); Сп – концентрация пептидного гидроксипролина (ммоль/л); Соб. – концентрация общего гидроксипролина (ммоль/л); Ссм. – концентрация суммарного гидроксипролина (ммоль/л), а Ссв – концентрация свободного гидроксипролина (ммоль/л).

В норме содержание свободного гидроксипролина в сыворотке крови составляет 1,4 мкг/мл (9,9 мкмоль/л); пептидосвязанного – 0,5–0,6 мкг/мл (5,34 мкмоль/л); белковосвязанного – 6–8 мкг/мл (62,9 мкмоль/л).

Тема 3.2. БИОХИМИЯ КРОВИ. ГЕМОСТАЗ

Актуальность

Кровь – жидкая соединительная ткань, внутренняя среда организма. Состоит из клеточных элементов и плазмы. Удельная плотность крови 1,055–1,065 г/л. Вязкость крови в 4–5 раз больше вязкости воды, что обусловлено высоким содержанием белка и эритроцитов. Содержание белков в крови составляет 65–85 г/л. На долю плазмы приходится около 55% от объема крови. Эритроциты составляют основную массу форменных элементов (44%), на долю других клеток (лейкоциты, тромбоциты) приходится 1%. Доля клеточных элементов в общем объеме крови называется гематокритом и составляет примерно 45%. Кровь выполняет важнейшие функции для многоклеточного организма. Она обеспечивает доставку питательных веществ и кислорода, удаление продуктов обмена веществ, а также осуществляет взаимодействие клеток между собой посредством растворенных в ней медиаторов.

Однако у жидкой среды есть и обратная сторона: то, что способно течь, способно и вытекать. В организме эволюционно создана система регуляции агрегатного состояния крови (РАСК), которая в нормальных условиях обеспечивает жидкое состояние крови и атромбогенность сосудистой стенки, а при повреждении сосуда способствует свертыванию крови и восстанавливает целостность сосудистого русла. Для функционирования данной системы существуют множество участников – это и клеточные элементы, и все продуценты эндотелия, гормоны, ферменты, молекулы адгезии, и т.д. В систему РАСК входят свертывающая, противосвертывающая, фибринолитическая, калликреин-кининовая и др. системы.

Совсем недавно, для понимания механизмов свертывания крови использовали «каскадную» модель, в которой выделяли «внешний», «внутренний» и «общий» пути активации тромбина

Дальнейшее изучение механизмов свертывания крови показало, что это представление весьма схематично и не полно, так как в организме человека оба пути тесно связаны между собой и с тромбоцитами. На основе этих знаний Н. Hoffman и D.M. Monroe (2001) предложили «клеточную» модель свёртывания крови (cell-based model of coagulation), которая представлена на рисунке 3.

Основные положения современной концепции свертывания крови *in vivo*:

1. *In vivo* процесс свертывания крови является единым и связан с гемостатическими реакциями тромбоцитов. Тромбоциты не только участвуют в активации коагуляционных факторов, но и выполняют функцию регуляции всего процесса свертывания крови.

2. Коагуляционный процесс в физиологических условиях ограничен зоной дефекта сосуда. Его нераспространению способствуют противосвертывающая система и нормально функционирующие эндотелиоциты.

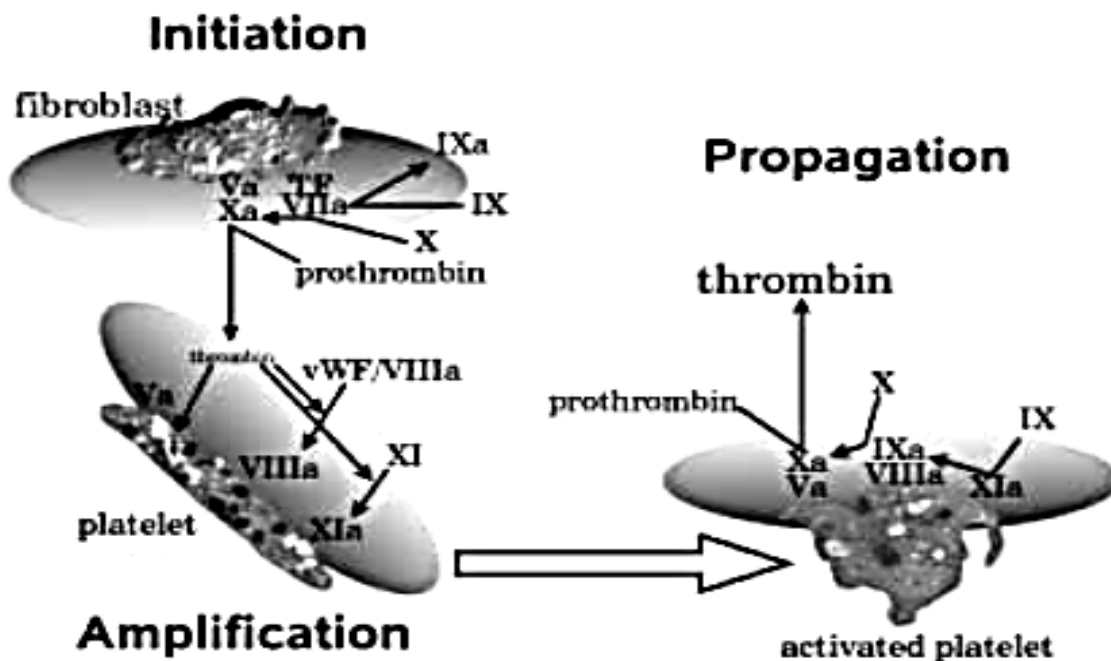


Рис. 3. Схематичное представление клеточной модели свертывания крови [Hoffman M., Monroe D.M., 2001]

3. Избыток тромбина в организме человека инактивируется антитромбином III, который также активен в отношении факторов XIIa, XIa, IXa, Xa (табл. 2).

4. Поддержанию крови в жидком состоянии способствуют ретикуло-эндотелиальная система и гепатоциты посредством специфического удаления активированных факторов свертывания крови и фибриногена без какого-либо влияния на предшественников, а также путем ограничения распространения коагуляции при участии ингибитора пути тканевого фактора (tissue factor path way inhibitor, TFPI), тромбомодулина, гепариноподобных гликозаминогликанов поверхности эндотелиоцитов.

Современная модель вторичного гемостаза включает три фазы:

- инициация: образуется комплекс «тканевой фактор (ТФ)/фактор VIIa» на поверхности субэндотелия в месте повреждения, что сопровождается продукцией тромбина);
- усиление процесса под воздействием тромбина активируется целый ряд коагуляционных факторов;
- распространение процесса (формируются теназный (VIIIa/IXa) и протромбиназный (Va/Xa/кальций/фактор III тромбоцитов) комплексы, что провоцирует так называемый тромбиновый взрыв (таблица 2). Результатом данных процессов является образование большого количества тромбина, который расщепляет молекулы фибриногена до молекул фибрин-мономера способного образовать стабильный сгусток фибрина.

Ключевой реакцией свертывания крови является превращение фибриногена в фибрин под действием тромбина. Все остальные сложные взаимодействия факторов свертывания, по нашим представлениям играют регуляторную роль. Эта сложная система регулирования жизненно необходима, так как позволяет организму создавать сгусток только там, где возникает повреждение сосуда и риск кровопотери, и именно того размера, который адекватен повреждению. Схема свертывания крови представлена на рисунке 4.

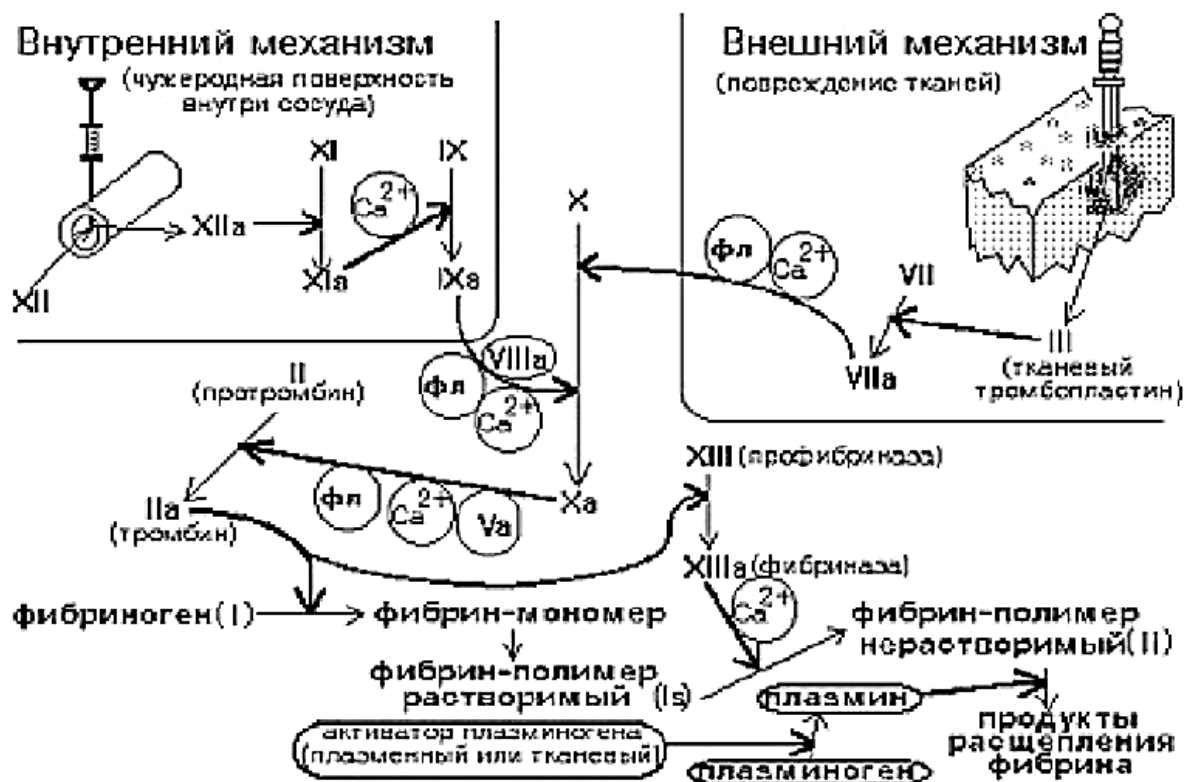


Рис. 4. Схема свертывания крови

Таблица 2

Характеристика факторов свертывания крови

Факторы	ММ, Да	Ген	Функции
XII	80 000	5q33-qter 12 000 н.п. 14 экзонов	Профермент, сериновая протеиназа, активирует XI, ПКК, VII факторы, синтезируется в гепатоцитах
XI	160 00	4q32-q35 23 000 н.п. 15 экзонов	Профермент, сериновая протеиназа, активирует IX фактор, синтезируется в гепатоцитах
ПКК	88 000	4q35 20 000 н.п. 15 экзонов	Профермент калликрейна, активирует XII, ВМК, VII факторы, синтезируется в гепатоцитах
ВМК	120 000	3q26-qter 27 000 н.п. 11 экзонов	Гликопротеин – кофактор, Активирует факторы XII, XI и ПКК, синтезируется в гепатоцитах

IX	57500	Xq27.1-q27.2 38060 н.п. 8 экзонов	Витамин К-зависимый профермент, сериновая протеиназа, активирует X фактор, синтезируется в гепатоцитах
VIII	330 00	Xq27 200 000 н.п. 26 экзонов	Кофактор IX фактора, церулоплазмин подобный связывающий белок, активирует X фактор, синтезируется в гепатоцитах
WF	275 000 мультимер	12p12-12pter 176 000 н.п. 52 экзонов	Структурный белок, опосредует адгезию тромбоцитов, синтезируется в эндотелиальных клетках, тромбоцитах, мегакариоцитами, гепатоцитами.
VII	55 000	13q34 13 000 н.п. 8 экзонов	Витамин К-зависимый профермент, сериновая протеиназа, активирует X и IX факторы, синтезируется в гепатоцитах
V	330 000	1q21-q25 80 000 н.п. 25 экзонов	Кофактор Ха фактора, церулоплазминсвязывающий белок, активирует протромбин, синтезируется в мегакариоцитах
X	59 000	13q34-qter 25 000 н.п. 8 экзонов	Витамин К-зависимый профермент, сериновая протеиназа, активирует протромбин, синтезируется в гепатоцитах
III		1p21-p22 13 000 н.п. 6 экзонов	Трансмембранный белок, кофактор VII фактора, синтезируется многими клетками
II	72 000	11q11-q12 25 000 н.п.	Профермент сериновой протеиназы, гидролизует факторы I, V, VIII, XIII, протеин C, синтезируется в гепатоцитах
I	340 00	4q23-q32 А α - 5400 н.п, 5 экзонов В β -8200 н.п 8 экзонов γ -8400 н.п 10 экзонов	Структурный белок, образует волокна фибрина, синтезируется в гепатоцитах
XIII	340 000	1q31.2-q31.3 цепь В 6p24-p25 цепь А 25 000 н.п.	Профермент трансглутаминазы, образует поперечные сшивки в фибрине, синтезируется в мегакариоцитах, костном мозге.

Лабораторная оценка гемостаза

1. Стадия. Образование протромбиназы 4,5–6,5 мин

Показатели:

- Время свертывания 5–10 мин
- Каолиновое время – 60–116 с
- АЧТВ 38–55 с
- Активность факторов XII, XI, IX, VIII, X

2. Стадия. Тромбинообразование 2–5 с

Показатели:

- Протромбиновое время

- Активность факторов V, VII, II
3. Стадия. **Фибринообразование 2–5 с**
Показатели:
- Тромбиновое время 15–18 с
 - Концентрация фибриногена
 - Активность фактора XIII.

3.2.1. Определение концентрации фибриногена

Фибриноген – это гликопротеин плазмы крови, превращающийся под действием тромбина в фибрин в процессе свертывания крови. Молекулярная масса фибриногена 340 кДа. Молекула фибриногена состоит из 6 полипептидных цепей, которые связаны друг с другом дисульфидными связями. Синтезируется фибриноген в рибосомах и микросомах гепатоцитов. Характеризуется высокой скоростью обмена: период полураспада у человека составляет в среднем около 3-х дней. Ежедневно образуется от 1,5 до 5 г фибриногена. Катаболизм фибриногена происходит в плазме крови, а также в клетках эндотелия сосудов и макрофагах.

Принцип

Определение времени свертывания разбавленной цитратной плазмы избытком тромбина. Время свертывания при этом пропорционально концентрации фибриногена, которую определяют по калибровочному графику (хронометрический метод по Clauss).

Реактивы:

1. Лиофилизат тромбина, 500 ед. НИН (*Приготовление: внести 5,0 мл растворителя для тромбина и растворить при +18...+25 °С*).
2. Растворитель тромбина.
3. Контрольная плазма (*Приготовление: внести 1,0 мл дистиллированной воды и растворить при +18...+25 °С*).
4. 1М трис-НСI буфер (*Приготовление: перенести содержимое флакона в цилиндр на 200 мл и довести до метки дистиллированной водой*).

Построение калибровочной кривой

В кювету внести 0,2 мл раствора №1 и инкубировать ровно 1 мин при 37 °С. По истечению времени добавить 0,1 мл рабочего раствора тромбина, запустить секундомер и отметить время свертывания. Аналогично определить время свертывания с калибровочными растворами №2–4. Схема приготовления растворов для калибровочной кривой представлена в таблице 3.

**Схема приготовления калибровочных растворов
для определения фибриногена**

Раствор №	Контр. плазма (мл)	Буфер (мл)	Разведение	Концентрация фибриногена, г/л
1	0,2	0,8	1:5	5,20
2	0,5 р-ра №1	0,5	1:10	2,60
3	0,5 р-ра №2	0,5	1:20	1,30
4	0,5 р-ра №3	0,2	1:28	0,92

По полученным данным построить калибровочную кривую, где по оси ординат отмечают время свертывания (с), а по оси абсцисс – концентрацию фибриногена (г/л).

Проведение анализа (мануальный вариант)

В кювету внести 0,2 мл плазмы и инкубировать ровно 1 мин при 37 °С. По истечению времени добавить 0,1 мл рабочего раствора тромбина, запустить секундомер и отметить время свертывания.

По калибровочному графику (рис. 5) находят концентрацию фибриногена в исследуемом образце.

Референтные значения 0,9–6,0 г/л.



Рис 5. Калибровочный график для определения фибриногена

Клоттинговые тесты

Для работы на коагулометре используются пластиковые одноразовые измерительные кюветы с шариками.



Измерительная кювета



Диспенсер шариков

Штатный объем пробы (плазмы или цельной крови) составляет 50 мкл; а объем реагента 50–100 мкл в зависимости от вида исследования. Минимальный объем реакционной смеси (проба+реагент) составляет 100 мкл.

Ход анализа

Тест	Проба, мкл	Реагент 1, мкл	Реагент 2, мкл
Протромбиновое время (плазма)	50	100	-
Протромбиновое время (кровь)	50	50	-
АЧТВ	50	50	50
Тромбиновое время	50	50	-
Фибриноген	100	50	-

Проведение анализа на коагулометре АПГ2-02

Анализ производится аналогично мануальному методу. Особенностью является проведение анализа в одноразовых кюветах с предварительно внесенным металлическим шариком (рис. 6).

Анализатор предназначен для определения параметров свертывания проб плазмы крови либо крови, приготовленных по методикам коагулометрического анализа. Определение производится путем измерения интервалов времени между моментом запуска таймера, сопровождающего ввод реагента, активирующего процесс образования сгустка или нитей фибрина, и моментом завершения теста. Запуск таймера производится либо вручную, либо автоматически после внесения реагента.

Время завершения теста автоматически регистрируется анализатором в зависимости от выбранного режима: для оптического – по изменению светопропускания исследуемой пробы при коагуляции, для механического – по остановке вращения шарика в кювете при изменении реологических свойств пробы при коагуляции (рис. 7).



Рис. 6. Анализатор показателей гемостаза АПГ2-02

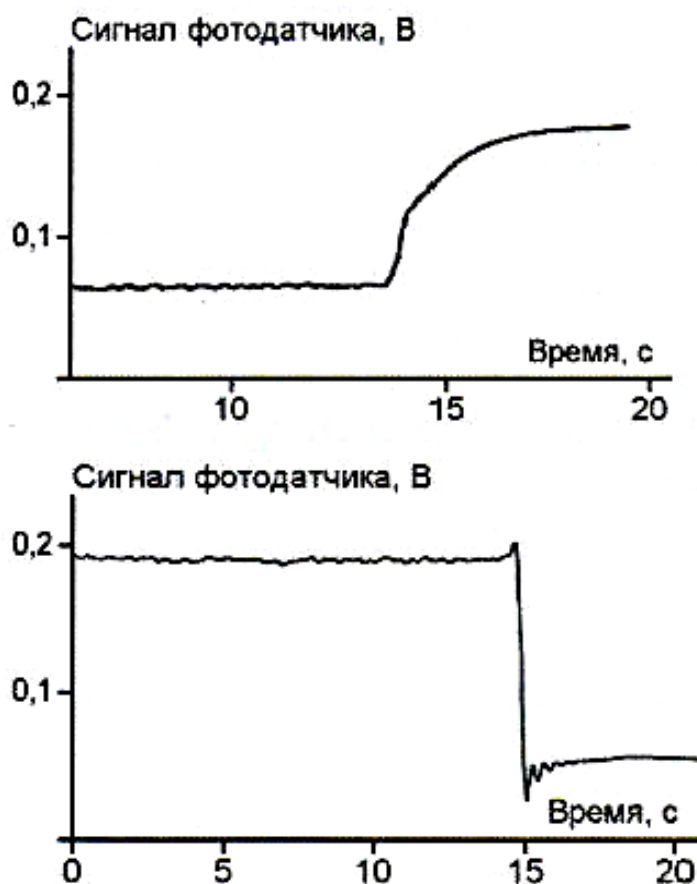


Рис. 7. Вид коагулограммы, получаемой с помощью анализатора АПГ2-02

Практическое значение

Фибриноген является одним из острофазных белков плазмы крови (показатель воспалительных процессов). Концентрация фибриногена используется в определении фактора риска развития тромбоза и развития сердечно-сосудистых заболеваний. Помимо этого, данный показатель повышается при заболеваниях печени, почек, инфаркте миокарда, ожогах, инфекционных заболеваниях.

3.2.2. Определение АПТВ (АЧТВ)

Активированное парциальное (частичное) тромбoplastиновое время (АПТВ, АЧТВ) является показателем оценки эффективности «внутреннего» (контактная активация) и общего пути свертывания.

Набор реагентов «Тех-Фибриноген-Тест», Технология Стандарт

Принцип

Определяется время свертывания плазмы крови в условиях стандартизированной контактной (каолином) и фосфолипидной (кефалином) активации процесса в присутствии ионов кальция.

Реактивы:

1. Кефалин (лиофильно высушенный фосфолипидный компонент)
Приготовление: внести во флакон 1,0 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при комнатной температуре.
2. Каолин (концентрированная суспензия 40:1 в дистиллированной воде).
3. 1М трис-НСI буфер.
4. 0,5 М Кальция хлорид.

Приготовление рабочих растворов

Рабочая суспензия каолина: концентрированный буфер трис-НСI и концентрированную суспензию каолина количественно перенести из флаконов в мерный цилиндр и общий объем довести дистиллированной водой до 40,0 мл.

АПТВ-реагент: смешать в 0,05 мл раствора кефалина с 0,6 мл рабочей суспензии каолина и выдержать при комнатной температуре в течение 15 мин.

Рабочий раствор CaCl_2 : концентрированный раствор кальция хлорида развести дистиллированной водой (1 объем CaCl_2 + 19 объемов H_2O).

Проведение анализа (мануальный вариант)

В пробирку внести 100 мкл исследуемой плазмы и добавить 100 мкл АПТВ-реагента.

Встряхнуть пробирки и поместить на водяную баню при температуре +37 °С.

Через 3 мин к смеси добавить 100 мкл рабочего раствора CaCl₂ (имеющего температуру +37 °С) и включить секундомер.

Достать пробирку из бани и отметить время свертывания (образования фибрина) при периодическом покачивании пробирки.

Данный вариант имеет субъективную оценку исследователя и не рекомендован в лабораторной практике. В методическом пособии представлен для ознакомления.

Определение АПТВ (АЧТВ) на коагулометре

Набор реагентов «МЛТ-АЧТВ», ЭМКО

Принцип

Определяется время свертывания цитратной плазмы в условиях стандартизированной активации контактной фазы раствором смеси фосфолипидов (растительного происхождения) и активатора (элаговой кислоты) в присутствии ионов кальция. При этом имитируется запуск свертывания по внешнему пути и выявляется возможный дефицит факторов, участвующих в нем, или наличие ингибиторов свертывания.

Реактивы:

1. АЧТВ-реагент (лиофильно высушенный фосфолипидный компонент) *Приготовление: внести во флакон 2,5 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при комнатной температуре. Стабилизация 30 мин.*
2. 0,025 М Кальция хлорид.

Проведение анализа на коагулометре АПГ2-0

Внести в кювету коагулометра	Объем, мкл
Плазма исследуемая (или контрольная)	50
АЧТВ-реагент	50
Инкубировать при +37 °С – 180 с	
Кальция хлорид (раствор 0,025 М), прогретый при +37 °С	100
Зафиксировать время свертывания	

Референтные значения

При мануальном тестировании АПТВ в плазме время свертывания составляет 30–42 с.

При коагулометрическом определении АПТВ в плазме время свертывания составляет 25–35 с.

Практическое значение

Контакт плазмы с частицами каолина стимулирует производство активного фактора Хагемана (XII) в XIIa, предоставляя контактную поверхность для функционирования высокомолекулярного кининогена, калли-

креина и фактора XIIIa. Для образования комплексов с активным фактором Стюарта–Прауэр (Ха) и протромбином необходимы фосфолипиды.

Удлинение АЧТВ – дефицит факторов за исключением VII, XIII, наличие ингибиторов свертывания, ДВС, фибринолиз.

Укорочение АЧТВ – гиперкоагуляция, риск развития тромбозов.

3.2.3. Определение протромбинового времени

Набор реагентов «МЛТ-ТРОМБОПЛАСТИН», ЭМКО

Принцип

Определяется время свертывания цитратной плазмы под влиянием тромбопластина (растворимого экстракта из тканей мозга кролика) в присутствии ионов кальция.

Реактивы:

Тромбопластин (лиофильно высушенная тромбопластин-кальциевая смесь) *Приготовление: внести во флакон 6,0 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при комнатной температуре. Стабилизация 30 мин.*

Проведение анализа на коагулометре АПГ2-02

Внести в кювету коагулометра	Объем, мкл
Плазма исследуемая (или контрольная)	50
Инкубировать при +37 °С – 60 с	
Тромбопластин-реагент, прогретый при +37 °С	100
Зафиксировать время свертывания	

Результаты анализа

Результаты выражают следующим образом:

1. Протромбиновое время (ПВ).
2. Процентное содержание протромбина по Квику (в %).

Процентное содержание протромбина по Квику определяется по калибровочному графику, который строится в координатах время свертывания в секундах от 1/% протромбина по Квику контрольной плазмы (рис. 8).

Для этого определяют время свертывания следующих разведений контрольной плазмы (плазмы-калибратора) (табл. 4).

Таблица 4

Приготовление разведений контрольной плазмы

Протромбин контрольной плазмы в %	A%	0,5A%	0,25A%
Контрольная плазма, мкл	250	250	250
Физиологический раствор, мкл	0	250	750

A-аттестованное значение % протромбина по Квику в контрольной плазме.

Координатная сетка для построения калибровочного графика по Квику.

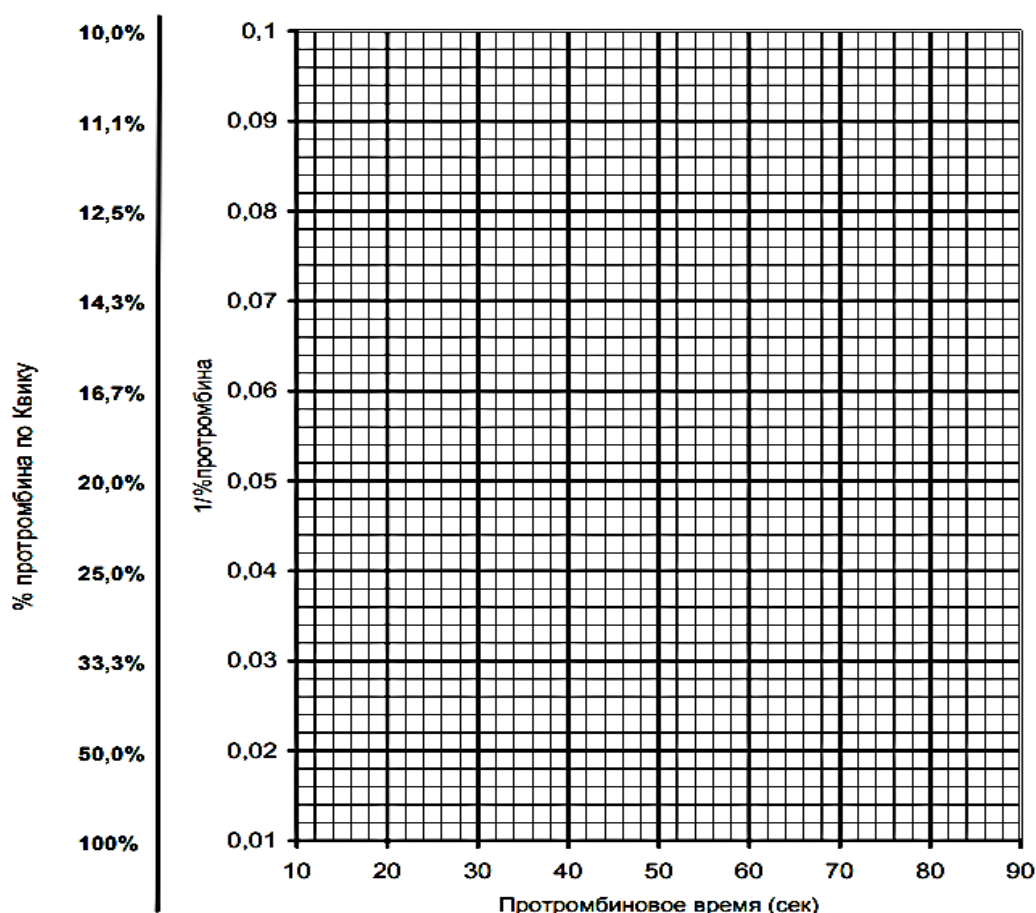


Рис. 8. Координатная сетка для построения калибровочного графика по Квику

Протромбиновое отношение (ПО) – отношение времени свертывания плазмы пациента к времени свертывания контрольной плазмы.

Международное нормализованное отношение (МНО) – протромбиновое отношение, возведенное в степень международного индекса чувствительности (МИЧ) тромбопластина.

$$\text{МНО} = (\text{ПВ}_{\text{пациента}} / \text{ПВ}_{\text{контр.}})^{\text{МИЧ}} = \text{ПО}^{\text{МИЧ}}$$

Референтные значения

Протромбиновое время 14–19 с. Процент содержания протромбина по Квику 70–130%.

- в предоперационном периоде для оценки риска возникновения кровотечения
- для мониторинга за лечением антикоагулянтами
- для оценки функции печени
- удлинение дефицит факторов внешнего пути, X, VII, V, II.
- терапия непрямыми антикоагулянтами считается адекватной, если ПТВ увеличивается в 2 раза.

3.2.4. Определение тромбинового времени

Тромбин – протеолитический фермент (КФ 3.4.21.5) свертывающей системы крови, катализирующий гидролитическое расщепление фибриногена до фибрин-мономеров, которые полимеризуются в фибрин – основу тромба. Тромбин относится к пептид-гидролазам, к подклассу сериновых протеиназ. Природный ингибитор тромбина – антитромбин III. Тромбин образуется из протромбина под влиянием фактора Ха (активного фактора Стюарта–Пауэра), находящегося в крови в форме профермента.

Состояние конечного этапа процесса свертывания крови (превращение фибриногена в фибрин) отражает тромбиновое время, которое определяется по времени свертывания плазмы крови под действием стандартного раствора тромбина.

Набор реагентов фирмы «Технология Стандарт»

Принцип

Определение времени свертывания плазмы крови под влиянием тромбина стандартной активности.

Реактивы:

1. Тромбин, 6–8 ед. НИИ.
2. Контрольная плазма.

Приготовление рабочих растворов

1. Разведение тромбина: во флакон с тромбином добавить 5,0 мл дистиллированной воды и растворить при комнатной температуре в течение 2–3 мин.
2. Разведение контрольной плазмы: во флакон с контрольной плазмой внести 0,5 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при комнатной температуре в течение 3 мин.

Проведение анализа

	Исследуемый образец плазмы	Контроль
Контрольная плазма, мл	-	0,2
Исследуемая плазма (больного), мл	0,2	-
Инкубировать при температуре +37 °С в течение 2 мин		
Раствор тромбина, мл	0,2	0,2
Включить секундомер и отметить время свертывания (образования фибрина) при периодическом покачивании пробирки		

Референтные значения

В нормальной плазме тромбиновое время составляет 15–18 с.

Практическое значение

Тромбиновое время (ТВ) характеризует конечный этап свертывания под влиянием тромбина, зависит от содержания фибриногена и ингибиторов. ТВ используется для контроля за лечением гепарином и фибринолитиками.

Удлинение ТВ может быть обусловлено следующими причинами:

- гипофибриногемией;
- дисфибриногемией;
- повышением содержания продуктов деградации фибрина ПДФ (при фибринолитической терапии);
- присутствием в крови антикоагулянтов прямого действия.

3.2.5. Тест генерации тромбина

Принцип

Тест генерации тромбина заключается в определении количества тромбина (в нМоль), который образуется при рекальцификации цитратной плазмы крови в присутствии фиксированной концентрации тканевого фактора и флюорогенного субстрата. С помощью флюориметра и компьютерной обработки данных за определённый отрезок времени измеряют площадь кривой генерации тромбина, имеющей восходящую часть, участок достижения максимума и нисходящую часть, характеризующую инактивацию этого фермента (рис. 9).

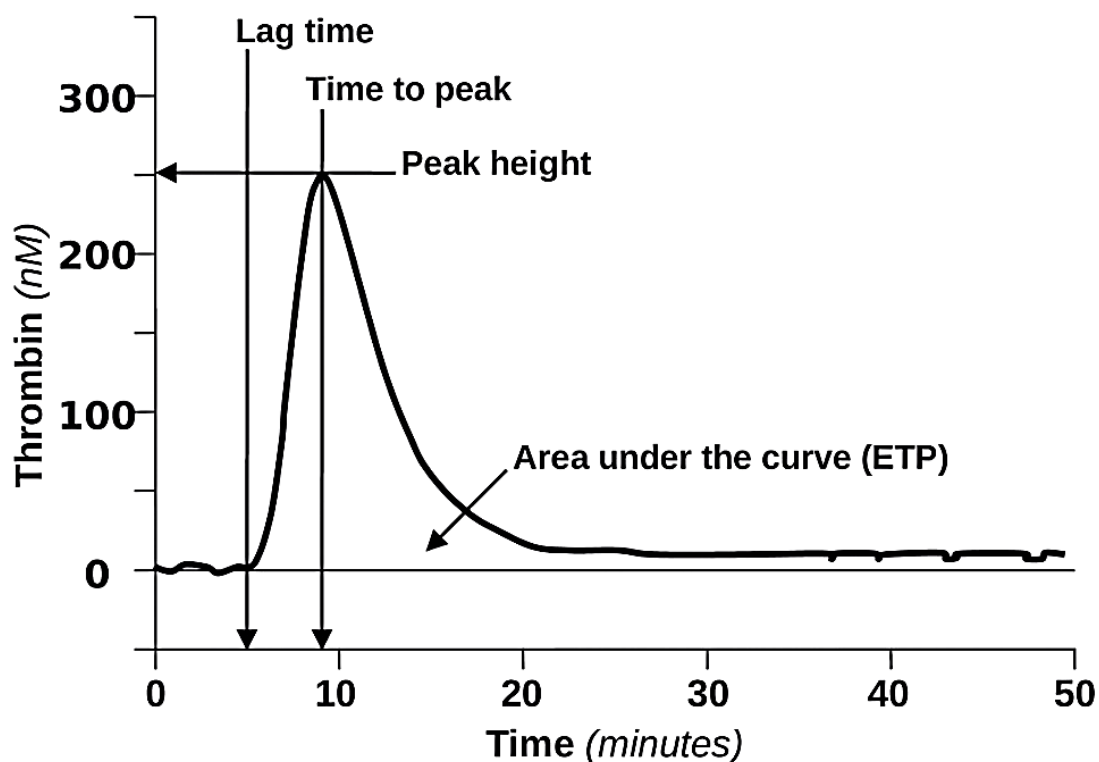


Рис. 9. Графическая кривая теста генерации тромбина

В качестве активатора свёртывания используют тканевой фактор человека и отрицательно заряженные фосфолипиды. После инкубации смеси при температуре +37 °С в лунку вносят буфер, содержащий ионизированный кальций и флюорогенный субстрат. Образующийся тромбин расщепляет субстрат, в результате чего высвобождается флюорофор. Его излучение регистрируют через равные промежутки времени, причём его интенсивность прямо пропорциональна концентрации образовавшегося тромбина, кривую генерации которого отмечают на графике.

Диагностические параметры тест генерации тромбина (рис. 9)

lag time (время запаздывания, мин) – время, измеренное от внесения смеси флюорогенного субстрата с ионизированным кальцием в лунку с образцом плазмы крови и активатором до момента значимого отклонения сигнала;

peak thrombin (пиковая концентрация тромбина, нмоль) – максимальная концентрация тромбина в единицу времени;

time to peak/ttpeak (время достижения пика тромбина, мин) – время, за которое достигается максимальная концентрация тромбина;

ETP (endogenous thrombin potential или эндогенный тромбиновый потенциал, нмоль×мин) – площадь под кривой генерации тромбина, учитывающей особенности инактивации этого фермента.

Тест обладает высокой чувствительностью к колебаниям тромбина при различных патологических состояниях. Однако тест генерации тромбина не характеризует финальный этап образования сгустка – наработку фибрина и его полимеризацию.

Тест тромбодинамики предназначен для исследования *in vitro* пространственно-временной динамики свёртывания крови, инициированной локализованным активатором свёртывания в условиях, близких к условиям свёртывания крови *in vivo*. Для его проведения образцы плазмы крови помещают в каналы прозрачной измерительной кюветы, которая находится в водяном термостате. Затем в каналы кюветы вводят специальную вставку (активатор), на торце которой нанесено нанопокрытие с активатором свёртывания (тканевой фактор). Процесс возникновения и роста фибринового сгустка регистрируется цифровой видеокамерой в рассеянном свете. Полученная серия кадров даёт детальную информацию о динамике свёртывания крови во времени и пространстве.

Диагностические параметры тромбодинамики (рис. 10)

Tlag (мин), лаг-тайм – время, которое проходит от момента контакта плазмы крови с активирующей поверхностью и до непосредственного начала роста сгустка;

Cs (мкм) – размер сгустка на 30-й минуте;

V (мкм/мин) – скорость роста сгустка, характеризует центральную фазу формирования сгустка – распространение свёртывания;

V_i (мкм/мин), начальная скорость роста сгустка;

T_{sp} (мин) – время появления спонтанных сгустков в объеме плазмы крови, характеризует собственный прокоагулянтный потенциал плазмы;

D (усл. ед.) – плотность и размеры сгустка, характеризуют структуру фибринового сгустка, концентрацию фибриногена в плазме крови и процесс роста сгустка в целом.

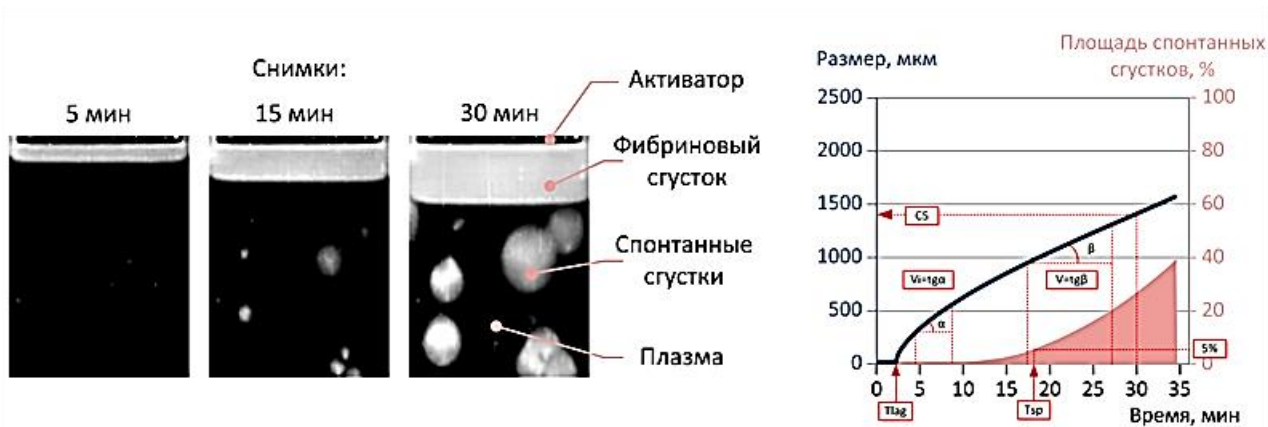


Рис. 10. Процесс формирования фибринового сгустка и его графическая регистрация

3.2.6. Определение концентрации антитромбина

Антитромбин III (АТ III) представляет собой гликопротеин, синтезируемый в гепатоцитах и сосудистом эндотелии. Его активирующим кофактором является гепарин. Главной функцией является инактивация тромбина (IIa) и фактора Ха, гораздо менее значимо воздействие на факторы IXa, XIa, XIIa, калликреин, комплекс TF-VIIa (рис. 11).



Рис. 11. Эффекты антитромбина III и гепарина

Антитромбин III относится к семейству серпинов – ингибиторов сериновых протеиназ. Антитромбин ковалентно связывается с активным центром тромбина (антитромбин как субстрат тромбина), что приводит к инактивации фермента и затем сформировавшийся комплекс элиминируется.

Принцип

АТ III с разведенной исследуемой плазмой в присутствии гепарина быстро инактивирует тромбин. Остаточная активность тромбина определяется по скорости гидролиза хромогенного субстрата фотометрически. Регистрируют изменение оптической плотности (поглощения) на фотометре при длине волны 405 нм после добавления уксусной кислоты (двухточечный метод).

Реактивы:

1. Хромогенный субстрат.
2. Тромбин, 500 ед. НИИ.
3. Буфер трис-НСI с гепарином.
4. Контрольная плазма.
5. Растворитель тромбина.

Приготовление рабочих растворов

Приготовление разведенной исследуемой плазмы: 0,05 мл смешать с 3,0 мл физиологического раствора хлорида натрия и 0,05 мл буфера трис-НСI с гепарином.

Приготовление Бланк-разведения: в 0,05 мл буфера трис-НСI с гепарином добавить 3,05 мл физиологического раствора хлорида натрия.

Разведение хромогенного субстрата: во флакон с хромогенным субстратом внести 7,5 мл дистиллированной воды и растворить при температуре +37 °С в течение 30 мин.

Разведение тромбина: во флакон с тромбином добавить 10,0 мл физиологического раствора хлорида натрия и растворить при комнатной температуре в течение 2 мин. Выдержать раствор при комнатной температуре в течение 30 мин.

Разведение рабочего раствора тромбина: к 0,1 мл маточного раствора тромбина добавить 1,6 мл растворителя тромбина.

Разведение контрольной плазмы: во флакон с контрольной плазмой внести 1,0 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при комнатной температуре в течение 3 мин. Концентрация АТ III в контрольной плазме: 98%.

Проведение анализа

	Исследуемый образец плазмы	Контрольные значения активности тромбина (КЗАТ)
Бланк-разведения, мл	-	0,25
Разведенная исследуемая плазма, мл	0,25	-
Рабочий раствор тромбина, мл	0,25	0,25
Перемешать и инкубировать при температуре +37 °С в течение 3 мин		
Добавить хромогенный субстрат, мл	0,25	0,25
Через 120 с внести:		
30% р-р уксусной кислоты, мл	0,5	0,5
Через 5–10 мин после внесения раствора уксусной кислоты определить поглощение (А) при длине волны 405 нм исследуемого образца против физиологического раствора хлорида натрия		

Расчеты:

Результаты анализа выражают в процентах к норме. Концентрацию АТ III вычисляют по формуле:

$$\text{АТ III, (\%)} = (\text{А}_{\text{кзат}} - \text{А}_{\text{образца}}) * \text{ФП};$$

$$\text{ФП, (\%)} = (\text{АТ III}_{\text{контрольной плазмы (\%)}}) / (\text{А}_{\text{кзат}} - \text{А}_{\text{(контрольная плазма)}}),$$

где:

$\text{А}_{\text{кзат}}$ – поглощение (оптическая плотность) в пробе с контрольным значением активности тромбина; $\text{А}_{\text{образца}}$ – поглощение (оптическая плотность) в исследуемом образце плазмы; ФП – фактор пересчета; АТ III контрольной плазмы (%) – известное содержание АТ III в контрольном образце плазмы; А контрольной плазмы – поглощение (оптическая плотность) в контрольном образце плазмы.

Референтные значения

В нормальной плазме концентрация АТ III составляет 75–140%.

Практическое значение

Определение АТ III используют для диагностики ДВС-синдрома и гематогенных тромбофилий, контроля за лечением этих состояний с использованием гепарина и препаратов крови.

3.2.7. Глобальные тесты в оценке системы гемостаза

Изученные интегральные тесты оценивают либо кластер факторов свертывания, либо отдельные факторы, участвующие в формировании сгустка. Цельную картину свертывания крови, возможно, получить, используя глобальные тесты. Принципиальной особенностью глобальных

тестов – это использования цельной крови, так как тромбоциты, эритроциты и лейкоциты так же, как и плазменные факторы являются участниками процесса свертывания крови. С помощью глобальных тестов возможно регистрировать весь процесс превращения фибринового сгустка и его возможный лизис. К глобальным тестам относится тромбоэластография. Метод основан на возможности измерять вязко-эластические свойства образующегося сгустка.

Тромбоэластография подразделяется на

- ротационную (TEG 5000 и ROTEM);
- вибрационную (АРП-01М Меднорд (НПТЭГ) и Соноклот).

Классическая тромбоэластография (ротационная)

Ротационный тромбоэластограф измеряет физические свойства сгустка крови, используя для этого специальную цилиндрическую чашечку, в которую помещается образец крови. Чашечка совершает вращательные движения относительно своей оси. Стержень, погруженный в образец крови, подвешен на скручивающейся нити. Крутящий момент вращающейся чашечки передается на погруженный в образец стержень только после того, как образующийся за счет фибрино-тромбоцитных связей сгусток начинают соединять чашечку и стержень вместе. Не свернувшаяся кровь не передает вращение, рыхлый сгусток лишь частично передает вращение, а прочный сгусток заставляет стержень двигаться синхронно с чашечкой. Таким образом, угол вращения стержня напрямую зависит от прочности сформированного сгустка.

Процесс образования сгустка с последующим его лизисом регистрируется графически (рис 12).

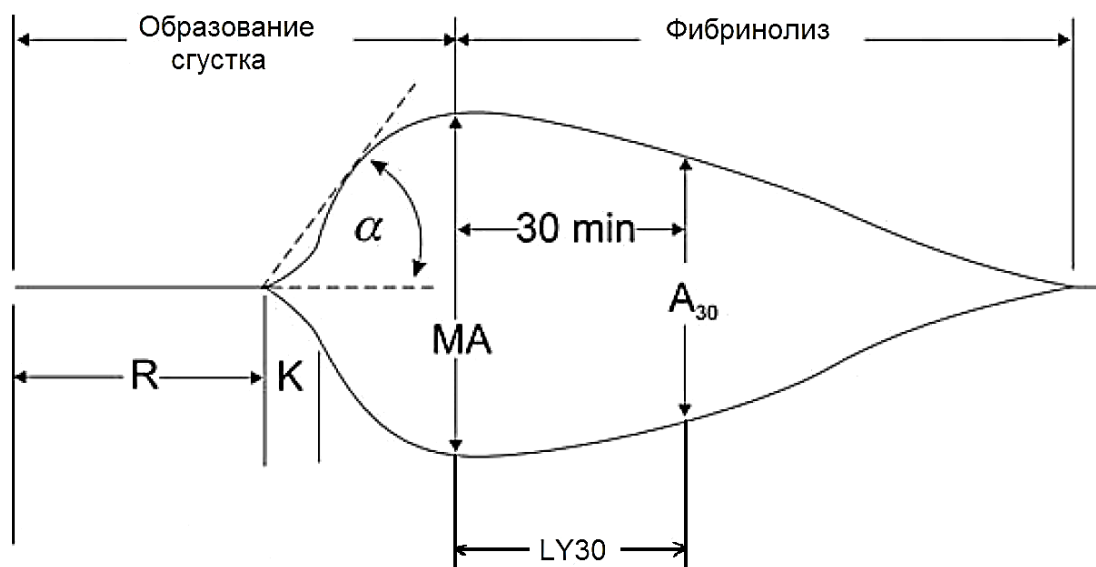


Рис.12. Графическое изображение классической тромбоэластограммы («TEG 5000»)

По полученной тромбоэластограмме компьютер автоматически выполняет расчет основных параметров:

R – время от момента постановки пробы до начала образования первых нитей фибрина,

K – время от начала образования первых нитей фибрина до достижения сгустком амплитуды 20 мм,

(α -Angle) – угол касательной к кривой,

MA – максимальная амплитуда,

Ly30 – процент, на который уменьшается величина (амплитуда) сгустка в течение 30 мин после достижения MA.

Низкочастотная пьезотромбоэластография (НПТЭГ)

Принцип метода основан на регистрации изменения сопротивления исследуемой среды резонансным колебаниям иглы-резонатора, закреплённой на пьезоэлектрическом элементе и опущенной в кювету с кровью пациента. Частота колебаний иглы в воздухе и жидкости одинакова и поддерживается автоматически. Объём исследуемой крови (0,45 мл) содержит минимальную, но достаточную (как для качественной, так и для количественной оценки) концентрацию всех факторов, участвующих в изучаемом процессе гемокоагуляции и фибринолиза. По результатам полученной амплитуды строят график агрегантного состояния крови, по которому и оценивают состояние системы гемостаза.

В основу анализа графического изображения НПТЭГ положены изменения относительных значений вязкоупругих свойств крови, происходящие во время коагуляции.

Динамика исследуемого процесса – переход крови в ходе коагуляции из жидкого состояния в твёрдо-эластичное – определяется изменениями агрегатного состояния крови и регистрируется в виде интегрированной кривой (рис. 13). Каждая точка, которой (A_i) определяется состоянием системы в конкретный момент времени исследования (T_i).

Метод НПТЭГ позволяет без предварительной пробоподготовки провести комплексную оценку всех звеньев гемокоагуляции в цельной крови пациентов.

Основные диагностические параметры НПТЭГ:

t1 – период реакции (время в мин от начала исследования до достижения минимальной амплитуды НПТЭГ – A1);

ИКК – интенсивность контактной коагуляции;

t2 – время достижения амплитуды;

ИКД – интенсивность коагуляционного драйва;

t3 – время свёртывания крови (ВСК) – точка желирования (ТЖ) в мин;

КТА – константа тромбиновой активности;

ИПС – интенсивность полимеризации сгустка;

MA – максимальная амплитуда;

t5 – время достижения максимальной амплитуды;

ИРЛС – интенсивность ретракции и лизиса сгустка;
 КСПА – коэффициент суммарной противосвертывающей активности.

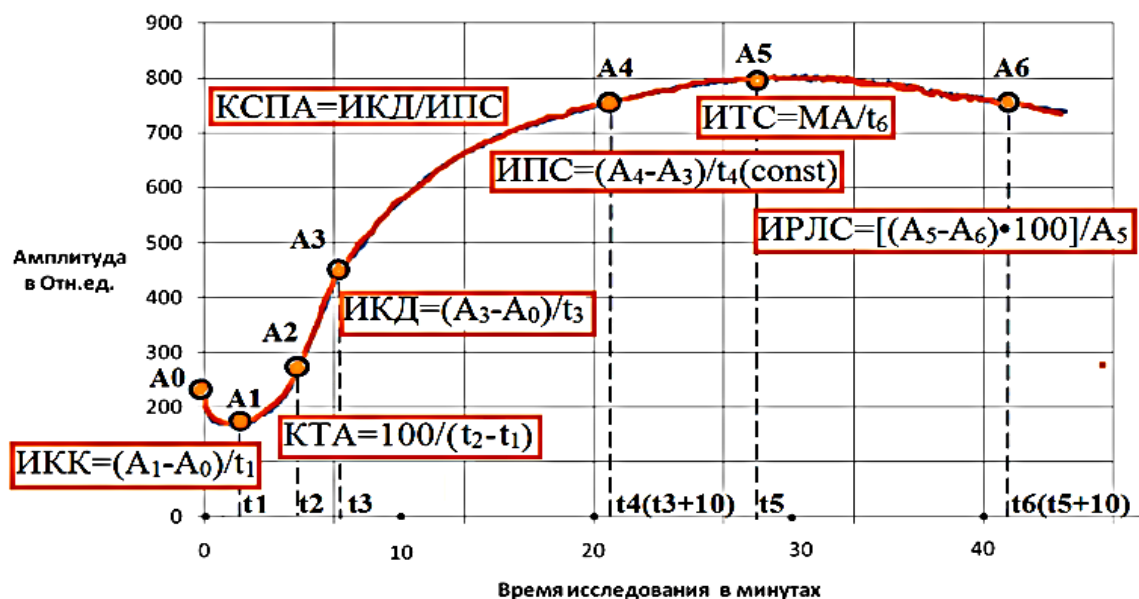


Рис. 13. Графическое изображения регистрируемых и расчетных параметров НПТЭГ

Анализ НПТЭГ основан на сопоставлении регистрируемой НПТЭГ с референтными показателями нормокоагуляционного состояния. В оценке эффектов лекарственных средств противотромботической направленности сопоставляются результаты исходных графиков НПТЭГ и графиков НПТЭГ после приема изучаемого препарата.

По показателям t_1 , ИКК и форме графика оценивают адгезивно-агрегационную активность тромбоцитов, и суспензионную стабильность форменных элементов крови.

По показателям t_1 и ИКК может быть оценена эффективность действия антиагрегантов.

Процесс свертывания крови (тромбинообразование) на тромбоэластограмме характеризуется следующими показателями: t_2 , КТА, t_3 , и ИКД.

Показатели t_2 и КТА являются критериями оценки интенсивности фаз инициации и амплификации.

t_3 (точка желирования) – время свертывания крови. Ключевой показатель, отражающий переход жидкого состояния крови в гелеобразное. Исследование показали, что T_3 совпадает с реализацией тромбинового взрыва и высоко коррелирует с временем достижения пиковой концентрации тромбина в тесте генерации тромбина.

ИКД – интенсивность коагуляционного драйва, отражает протеолитический этап и вклад противосвертывающей системы в формировании общего коагуляционного тренда.

Следующий этап характеризует фронтальную и латеральную сборку мономеров фибрина и образования протофибрил с последующей их по-

лимеризацией и поперечной сшивкой. Одновременно со сборкой фибрин-полимеров активизируются процессы ретракции сгустка. Результирующим показателем полимеризации и ретракции является ИПС, МА, Т5.

По показателям ИПС, МА, Т5 судят об эффективности антиагрегантов, антикоагулянтов и тромболитиков.

Антикоагулянтная активность крови обусловлена функционированием нескольких групп ингибиторов. Суммарный вклад противосвертывающей системы оценивают по показателю – КСПА.

Возможный лизис образовавшегося на предыдущих этапах сгустка оценивают по показателю ИРЛС. Оценка литической активности в исследуемой пробе крови представляет собой интегративную составляющую фибринолитической системы и вклада лейкоцитарных протеаз, находящихся именно в данном объеме крови.

Таким образом на сегодняшний день в арсенале врачей имеется большое количество способов оценки функциональной диагностики состояния крови.

СЕМИНАР **«Биохимический состав соединительной ткани»**

1. Соединительная ткань, локализация, взаимосвязь строения и функций. Фибриллярные белки внеклеточного матрикса. Особенности организации коллагена костной ткани. Эластин, десмозин.
2. Протеогликаны и гликозаминогликаны. Адгезивные и антиадгезивные белки. Катаболизм белков межклеточного матрикса: роль матриксных металлопротеиназ, ТИМП 1 и 2.
3. Биохимические маркеры синтеза коллагена: производные коллагена (PICP и PINP), пролил-, лизилгидроксилазы, фибронектин, щелочная фосфатаза.
4. Маркеры распада коллагена: гидроксипролин, пиридинолин, активность коллагеназы, эластазы, ГАГ, галактозилгидроксилизин и гликозил-галактозилгидроксилизин, кислая фосфатаза.
5. Показатели, характеризующие первую стадию свертывания крови: время свертывание, каолиновое время, АЧТВ. Клинико-диагностическое значение.
6. Показатели, характеризующие стадию тромбинообразование. Протромбиновое время, требования к препарату тромбопластина. Международное нормализованное отношение. Клинико-диагностическое значение.
7. Показатели, характеризующие конечную стадию свертывания. Тромбиновое время Концентрация фибриногена, Определение растворимого фибрина или РФМК. Этаноловый тест, протаминовый тест. Фенантролиновый тест. Клинико-диагностическое значение.
8. Ядовитая диагностика нарушений гемостаза.

9. Особенности метаболизма жировой ткани в зависимости от локализации. Жировая ткань, как эндокринный орган.
10. Адипокины и их функции. Гормональная регуляция липогенеза и липолиза в адипоцитах. Биохимия алиментарного ожирения.

Тестовые задания

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. ОПРЕДЕЛИТЕ ПОРЯДОК РЕАКЦИЙ ОБРАЗОВАНИЯ ПРОКОЛЛАГЕНА В ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОМ РЕТИКУЛУМЕ
 - 1) гидроксирование пролина и лизина
 - 2) удаление N-концевой сигнальной последовательности
 - 3) образование внутри- и межмолекулярных дисульфидных связей
 - 4) образование тройной спирали
 - 5) гликозилирование
2. ОПРЕДЕЛИТЕ ПОРЯДОК СИНТЕЗА КОЛЛАГЕНА В МЕЖКЛЕТОЧНОМ ПРОСТРАНСТВЕ:
 - 1) окисление лизиновых, оксипролиновых и гликозилированных остатков в альдегиды
 - 2) образование незрелых коллагеновых фибрилл
 - 3) удаление амино- и карбоксиконцевых пептидов
 - 4) образование перекрестных связей между цепями фибрилл
3. ВЫБЕРИТЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ХАРАКТЕРИЗУЮЩИЕ
 - А) протеогликаны
 - 1) на долю белка приходится 80–90% от общей массы
 - Б) гликопротеины
 - 2) углеводный компонент – олигосахариды
 - 3) локализация – межклеточное вещество
 - 4) углеводный компонент – гетерогенные олигосахариды
 - 5) на долю белка приходится 1–5% от общей массы
 - 6) локализация – мембраны, плазма крови
4. ВЫБЕРИТЕ АМИНОКИСЛОТЫ, ПРЕОБЛАДАЮЩИЕ В
 - А) эластине
 - 1) аланин
 - Б) коллагене
 - 2) пролин
 - 3) валин
 - 4) триптофан
 - 5) цистеин
 - 6) оксипролин

5. ВЫБЕРИТЕ ОСОБЕННОСТИ, ХАРАКТЕРНЫЕ ДЛЯ

- | | |
|-----------------|---|
| А) коллагена | 1) фибриллярный белок |
| Б) эластина | 2) глобулярный белок |
| В) обоих белков | 3) содержит аминокислоту десмозин |
| | 4) имеет надмолекулярную структуру |
| | 5) преобладающими аминокислотами являются пролин и оксипролин |
| | 6) образуют волокна |
| | 7) содержат в больших количествах глицин |

6. УКАЖИТЕ, ГДЕ ПРОИСХОДЯТ ПЕРЕЧИСЛЕННЫЕ НИЖЕ ЭТАПЫ СИНТЕЗА КОЛЛАГЕНА

- | | |
|----------------------------|--------------------------------------|
| А) рибосомы фибробластов | 1) синтез препроколлагена |
| Б) цитоплазма фибробластов | 2) образование фибрилл |
| В) межклеточное вещество | 3) формирование проколлагена |
| | 4) формирование коллагеновых волокон |

7. КАК ИЗМЕНЯТСЯ БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ ПРИ СТАРЕНИИ?

- | | |
|---------------|--|
| А) увеличится | 1) соотношение основное вещество/волокно |
| Б) уменьшится | 2) обмен коллагена |
| | 3) активность гиалуронидазы |
| | 4) активность коллагеназы |
| | 5) потеря оксипролина |
| | 6) содержание гиалуроновой кислоты |
| | 7) соотношение содержаний кератансульфата к хондроитинсульфату |

8. ПРОТЕОГЛИКАНОВЫЙ АГРЕГАТ СОДЕРЖИТ

- 1) хондроитинсульфаты
- 2) коровый белок
- 3) гепарин
- 4) кератансульфаты
- 5) связывающий белок
- 6) гиалуроновую кислоту
- 7) дерматансульфаты
- 8) альбумин

9. ПОПЕРЕЧНЫЕ СШИВКИ В МОЛЕКУЛЕ ЭЛАСТИНА ОБРАЗУЮТСЯ С УЧАСТИЕМ СЛЕДУЮЩИХ АМИНОКИСЛОТ
- 1) десмозина
 - 2) лизина
 - 3) лизинорлейцина
 - 4) изодесмозина
 - 5) лейцина
 - 6) глицина
10. ДЕСМОЗИН – ЭТО
- 1) 4 остатка лизина
 - 2) 4 остатка оксилизина
 - 3) 4 остатка аргинина
 - 4) 4 остатка валина
11. НАЗОВИТЕ ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ
- 1) большое содержание клеток
 - 2) малое содержание клеток
 - 3) богата межклеточным веществом
 - 4) содержит большое количество липидов
 - 5) содержит большое количество белков
 - 6) богата фибрильными структурами
12. НАДМОЛЕКУЛЯРНАЯ СТРУКТУРА КОЛЛАГЕНА - ЭТО
- 1) альфа спираль полипептидной цепи
 - 2) объединение полипептидных цепей в фибриллу
 - 3) объединение фибрилл тропоколлагена
13. ВЫБЕРИТЕ АМИНОКИСЛОТЫ, ОТСУТСТВУЮЩИЕ В МОЛЕКУЛЕ КОЛЛАГЕНА
- 1) аланин
 - 2) триптофан
 - 3) пролин
 - 4) лейцин
 - 5) метионин
 - 6) валин
14. В СОСТАВЕ КОЛЛАГЕНА У ДЕТЕЙ
- 1) больше оксипролина
 - 2) меньше оксипролина
 - 3) меньше сшивок между фибриллами
 - 4) больше ковалентных сшивок между фибриллами

15. КОРОВЫЙ БЕЛОК – ЭТО
- 1) белок, объединяющий протеогликаны в углеводно-белковые комплексы (УБК)
 - 2) белок, объединяющий глюкозамингликаны в протеогликаны
16. КАКИЕ СВЯЗИ СТАБИЛИЗИРУЮТ КОЛЛАГЕНОВОЕ ВОЛОКНО?
- 1) водородные, нековалентные
 - 2) альдольные, ковалентные
 - 3) адсорбционные
 - 4) ионные
 - 5) пептидные
17. КАКИЕ УСЛОВИЯ НЕОБХОДИМЫ ДЛЯ ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ ПРОЛИНА ПРИ СИНТЕЗЕ КОЛЛАГЕНА?
- 1) ионы Fe
 - 2) НАДФН
 - 3) НАД
 - 4) аскорбиновая к-та
 - 5) кислород
 - 6) пролилгидроксилаза
18. МЕЖКЛЕТОЧНОЕ ВЕЩЕСТВО В СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ ПРЕДСТАВЛЕНО
- 1) протеогликанами
 - 2) гликопротеинами
 - 3) гетерополисахаридами
 - 4) углеводно-белковыми комплексами
19. ТРОПОКОЛЛАГЕН – ЭТО
- 1) суперспираль, объединяющая три ППЦ
 - 2) одна ППЦ коллагена
 - 3) волокно, объединяющее фибриллы коллагена
20. КАКИЕ АМИНОКИСЛОТЫ УЧАСТВУЮТ В ФОРМИРОВАНИИ ВОДОРОДНЫХ СВЯЗЕЙ ТРОПОКОЛЛАГЕНА?
- 1) аланин
 - 2) оксипролин
 - 3) лизин
 - 4) глицин
21. ПРОКОЛЛАГЕН – ЭТО
- 1) 3-х цепочечная спираль, содержащая не гидроксигликованные лизин и пролин

- 2) три полипептидные цепи, не сформированные в спираль, имеющие добавочные аминокислотные последовательности у С- и N-концов
- 3) одноцепочечная спираль коллагена с гидроксильными и гликозилированными аминокислотами

22. ПОЧЕМУ С ВОЗРАСТОМ СУТОЧНОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ ОКСИПРОЛИНА С МОЧОЙ УМЕНЬШАЕТСЯ?

- 1) с возрастом увеличивается распад коллагена из-за уменьшения связей, стабилизирующих молекулу
- 2) с возрастом замедляется распад коллагена из-за возрастания ковалентных связей
- 3) с возрастом активируется коллагеназа
- 4) с возрастом ингибируется коллагеназа

23. ПЕРЕЧИСЛИТЕ ФУНКЦИИ ПРОТЕОГЛИКАНОВ В СОСТАВЕ МЕЖКЛЕТОЧНОГО ВЕЩЕСТВА СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

- 1) опорная
- 2) фильтрация микроорганизмов
- 3) депонирование ионов
- 4) энергетическая
- 5) кофакторная
- 6) гидроосмотическая

24. ЧЕМ ОТЛИЧАЕТСЯ КОЛЛАГЕН ТИПА АЛЬФА -1 ОТ АЛЬФА-2?

- 1) по составу и чередованию аминокислот
- 2) по количеству ППЦ в коллагене
- 3) по прочности связи фибрилл в коллагеновом волокне

25. СИНТЕЗ ПРЕ-ПРО-КОЛЛАГЕНА ПРОИСХОДИТ

- 1) в аппарате Гольджи, внутри ретикулоэндотелиальной системы
- 2) в ядре
- 3) в рибосоме

26. ПРИ ГИПЕРВИТАМИНОЗЕ Д3 ПРОИСХОДИТ ДЕСТРУКЦИЯ КАК МИНЕРАЛЬНЫХ, ТАК И ОРГАНИЧЕСКИХ КОМПОНЕНТОВ КОСТИ. КОНЦЕНТРАЦИЯ КАКИХ КОМПОНЕНТОВ БУДЕТ УВЕЛИЧИВАТЬСЯ В МОЧЕ?

- 1) коллагена
- 2) глицина
- 3) оксипролина
- 4) оксипролина

27. ЧТО ОБЩЕГО У КОЛЛАГЕНА И ЭЛАСТИНА?

- 1) небольшое содержание оксипролина
- 2) фибриллярные белки

- 3) большое содержание глицина
- 4) образуют волокна
- 5) содержат десмозин
- 6) обладают упругостью
- 7) имеют надмолекулярную структуру

28. КАКОВА ФУНКЦИЯ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ В ОРГАНИЗАЦИИ МЕЖКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА?

- 1) участвует в связывании со структурными белками
- 2) связывает протеогликаны, образуя структуру «ерша»
- 3) связывает гликозамингликаны, образуя структуру «ерша»

29. ГЛИЦИН КОЛЛАГЕНА УЧАСТВУЕТ В ФОРМИРОВАНИИ СВЯЗЕЙ

- 1) альфа-спирали ППЦ
- 2) коллагенового волокна
- 3) суперспирали тропоколлагена
- 4) в образовании водородных связей
- 5) в образовании альдольной связи

30. КОЛЛАГЕН СОДЕРЖИТ

- 1) одну ППЦ (полипептидную цепь)
- 2) более 100 ППЦ
- 3) пролин, триптофан
- 4) глицин, оксипролин
- 5) моносахариды
- 6) гетерополисахариды

31. В ФОРМИРОВАНИИ СВЯЗИ МЕЖДУ ФИБРИЛЛАМИ КОЛЛАГЕНА УЧАСТВУЮТ

- 1) глюкоза и галактоза
- 2) оксипролин и лизин
- 3) глицин и пролин

32. НАРУШЕНИЕ СТРУКТУРЫ КОЛЛАГЕНА, СВЯЗАННОЕ СО СНИЖЕНИЕМ АКТИВНОСТИ ПРОЛИЛГИДРОКСИЛАЗЫ СВЯЗАНО С

- 1) дефицитом витамина С
- 2) мутациями в ДНК фибробластов
- 3) дефицитом меди
- 4) дефицитом витамина А
- 5) недостаточностью кислорода

33. КАКИЕ ВИТАМИНЫ МОГУТ ЯВИТЬСЯ ПРИЧИНОЙ НАРУШЕНИЯ ОБРАЗОВАНИЯ КОЛЛАГЕНОВОГО ВОЛОКНА

- 1) биотин
- 2) витамина С

- 3) витамина А
- 4) витамин В12

34. УКАЖИТЕ СВОЙСТВА, ХАРАКТЕРНЫЕ ДЛЯ ЭЛАСТИНА (ОТЛИЧНЫЕ ОТ КОЛЛАГЕНА)
- 1) имеет много генетических типов
 - 2) имеет один генетический тип
 - 3) представлен тройной спиралью
 - 4) состоит из одной спирали
 - 5) первичная структура состоит из последовательности аминокислотных остатков (Гли-Х-У)
 - 6) содержит углеводный компонент
35. КАКИЕ ФАКТОРЫ МОГУТ ЯВИТЬСЯ ПРИЧИНОЙ НАРУШЕНИЯ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ КОЛЛАГЕНА?
- 1) дефицит витамина С
 - 2) мутации в ДНК фибробластов
 - 3) дефицит меди
 - 4) недостаток витамина А
 - 5) недостаточность кислорода
36. ОБ ОБМЕНЕ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ СУДЯТ ПО ВЫВЕДЕНИЮ С МОЧОЙ
- 1) мочевины
 - 2) оксипролина
 - 3) глицина
 - 4) мочевой кислоты
 - 5) гиалуроновой кислоты
37. ВИТАМИН С ПРИНИМАЕТ УЧАСТИЕ В
- 1) синтезе гликогена
 - 2) созревании коллагена
 - 3) синтезе гемоглобина
 - 4) синтезе нуклеиновых кислот
 - 5) синтезе фосфолипидов мембран

СЕМИНАР
«Биохимия жировой ткани»

- 1. Основные разновидности жировой ткани и множественность функций.
- 2. Анатомическая локализации белой жировой ткани. Особенности метаболизма подкожного и висцерального жира.
- 3. Периоды жизни человека, в течение которых происходит физиологическая гиперплазия адипоцитов белого жира.

4. Транспортные формы сывороточных липопротеинов, доставляющих неэстерифицированные жирные кислоты в адипоциты.
5. Современное представление об адипоцитокинах и их функциях в организме.
6. Эндокринная регуляция метаболизма белого жира. Механизмы активации перилипина, гормончувствительной липазы адипоцитов и особенности липолитического каскада.
7. Молекулярный механизм ингибирования инсулином липолиза в адипоцитах.

Тестовые задания по теме: «Биохимия жировой ткани»

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. **ВЫБЕРИТЕ ФУНКЦИИ, КОТОРЫЕ НЕ ХАРАКТЕРНЫ ДЛЯ БЕЛОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ**
 - 1) депонирующая-энергетическая
 - 2) терморегуляционно-теплоизоляционная
 - 3) сократительный термогенез
 - 4) эндокринно-регуляторная функция
 - 5) несократительный термогенез
2. **УВЕЛИЧЕНИЕ МАССЫ БЕЛОГО ЖИРА КАКОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ ПРОГНОСТИЧЕСКИ НАИБОЛЕЕ НЕБЛАГОПРИЯТНО?**
 - 1) подкожный жир
 - 2) абдоминальный жир
 - 3) жир в области талии и бедер
 - 4) висцеральный жир
 - 5) жир в составе капсул, окружающих почки
3. **ВЫБЕРИТЕ ПЕРИОДЫ ЖИЗНИ ЧЕЛОВЕКА, В ТЕЧЕНИЕ КОТОРЫХ ПРОИСХОДИТ ГИПЕРПЛАЗИЯ АДИПОЦИТОВ БЕЛОГО ЖИРА**
 - 1) первые 2–3 мес. внутриутробного периода развития плода
 - 2) после полного завершения периода полового созревания
 - 3) последние три месяца внутриутробного развития плода и до достижения ребенком полуторогодовалого возраста
 - 4) наступление периода менопаузы
 - 5) в течение периода полового созревания
4. **НАЗВИТЕ КЛАССЫ СЫВОРОТОЧНЫХ ЛИПОПРОТЕИНОВ, ДОСТАВЛЯЮЩИЕ СВОБДНЫЕ (НЕЭСТЕРИФИЦИРОВАННЫЕ) ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ В АДИПОЦИТЫ БЕЛОГО ЖИРА**
 - 1) ЛПОНП
 - 2) ЛПВП
 - 3) ЛПНП

- 4) насцентные ХМ
- 5) ремнантные ХМ

5. УКАЖИТЕ СОЕДИНЕНИЕ, КОТОРОЕ НЕ СИНТЕЗИРУЕТСЯ В АДИПОЦИТАХ БЕЛОГО ЖИРА
- 1) лептин
 - 2) резистин
 - 3) адипсин
 - 4) грелин
 - 5) ингибитор-1 активатора плазминогена
6. УКАЖИТЕ ПРОЦЕСС В АДИПОЦИТАХ, КОТОРЫЙ НЕ АКТИВИРУЕТСЯ ИНСУЛИНОМ В ТЕЧЕНИЕ АБСОРБТИВНОГО ПЕРИОДА
- 1) транспорт глюкозы в адипоцит
 - 2) пентозофосфатный путь
 - 3) гликолиз
 - 4) липолиз
 - 5) синтез липопротеинлипазы эндотелия капилляров
7. УКАЖИТЕ РЕАКЦИЮ, КОТОРАЯ В АДИПОЦИТАХ ЯВЛЯЕТСЯ ИСТОЧНИКОМ ГЛИЦЕРОЛ-3-ФОСФАТА ДЛЯ СИНТЕЗА ТАГ
- 1) реакция переаминирования с пирувата с кетоглутаратом
 - 2) реакция, катализируемая глицерол-3-фосфатдегидрогеназой
 - 3) реакция, катализируемая фосфоенолпируваткарбоксихиназой
 - 4) реакция, катализируемая альдолазой
 - 5) реакция, катализируемая глицеролфосфатацилтрансферазой
8. НАЗОВИТЕ ГОРМОНЫ – АКТИВАТОРЫ ГОРМОНЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ ЛИПАЗЫ АДИПОЦИТОВ
- 1) адреналин и глюкагон
 - 2) глюкагон и инсулин
 - 3) инсулин и адреналин
 - 4) инсулин, глюкагон и адреналин
 - 5) глюкагон и альдостерон
9. ВЫБЕРИТЕ МЕХАНИЗМ АКТИВАЦИИ БЕЛКА ПЕРИЛИПИНА В АДИПОЦИТАХ
- 1) фосфорилирование по тирозину
 - 2) фосфорилирование по серину
 - 3) дефосфорилирование фосфотирозина
 - 4) дефосфорилирование фосфосерина
 - 5) активация фосфодиэстеразы цАМФ

10. ЛИПОЛИТИЧЕСКИЙ КАСКАД ПРИ МОБИЛИЗАЦИИ ДЕПО В АДИПОЦИТАХ НАЧИНАЕТСЯ С ОБРАЗОВАНИЯ
- 1) моноацилглицерола
 - 2) глицерола
 - 3) диацилглицерола
 - 4) глицеральдегид-3-фосфата
 - 5) свободной (неэстерифицированной) жирной кислоты
11. УКАЖИТЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ ИНГИБИРОВАНИЯ ИНСУЛИНОМ ЛИПОЛИЗА В АДИПОЦИТАХ
- 1) дефосфорилирование гормончувствительной липазы
 - 2) активация фосфодиэстеразы цАМФ
 - 3) активация фосфопротенифосфатазы-1
 - 4) стимуляция фосфодиэстеразы цАМФ в сочетании с дефосфорилированием гормончувствительной липазы
 - 5) сочетание активации фосфодиэстеразы цАМФ и ингибирования фосфопротенифосфатазы-1
12. УКАЖИТЕ РАЗМЕРНОСТЬ ИНДЕКСА МАССЫ ТЕЛА:
- 1) кг/см²
 - 2) кг/м
 - 3) кг/л
 - 4) кг/м²
 - 5) см/см (окружность талии/окружность бедер)

Тестовые задания по теме: «Биохимия крови»

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. УГЛЕКИСЛЫЙ ГАЗ ТРАНСПОРТИРУЕТСЯ КРОВЬЮ В РАЗНЫХ СОСТОЯНИЯХ. РАСПОЛОЖИТЕ СЛЕДУЮЩИЕ ТРАНСПОРТНЫЕ ФОРМЫ CO₂ ПО СТЕПЕНИ ПРОЦЕНТНОГО ПРЕОБЛАДАНИЯ В ОБЩЕЙ ДОЛЕ ТРАНСПОРТИРУЕМОЙ УГЛЕКИСЛОТЫ
- 1) карбгемоглобин
 - 2) бикарбонат
 - 3) физически растворенный CO₂
2. РАСПОЛОЖИТЕ РЕАКЦИИ СИНТЕЗА ГЕМА В ТОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ, В КОТОРОЙ ОНИ ПРОТЕКАЮТ В ОРГАНИЗМЕ
- 1) образование порфобиллиногена
 - 2) образование δ-аминолевулиновой кислоты
 - 3) образование протопорфирина IX
 - 4) присоединение железа

3. ПОДБЕРИТЕ К УКАЗАННЫМ ТИПАМ ГЕМОГЛОБИНА СООТВЕТСТВУЮЩИЕ НАБОРЫ ПОЛИПЕПТИДНЫХ ЦЕПЕЙ

- | | |
|----------|-----------------------|
| А) Hb A1 | 1) $\alpha_2\gamma_2$ |
| Б) Hb A2 | 2) $\alpha_2\beta_2$ |
| | 3) $\alpha_2\delta_2$ |

4. ОПРЕДЕЛИТЕ УЧАСТОК В ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ, ПРИНАДЛЕЖАЩИЙ НОРМАЛЬНОМУ ГЕМОГЛОБИНУ И ГЕМОГЛОБИНУ S

- | | |
|--------------------------|-------------------------------------|
| А) нормальный гемоглобин | вал-гис-лей-тре-про-глу-глу-лиз-... |
| Б) гемоглобин S | вал-гис-лей-тре-про-вал-глу-лиз-... |

5. СРАВНИТЕ ДВА БЕЛКА, УЧАСТВУЮЩИЕ В ОБМЕНЕ ЖЕЛЕЗА

- | | |
|-----------------------|--|
| А) только трансферрин | 1) содержит негемовое железо |
| Б) только ферритин | 2) содержит гемовое железо |
| | 3) гликопротеин плазмы крови |
| | 4) депонирует железо в клетках организма |

6. СРАВНИТЕ ФУНКЦИИ РАЗНЫХ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ КРОВИ

- | | |
|--------------------------|--|
| А) альбумины | 1) обеспечивают иммунитет |
| Б) α_1 глобулины | 2) обеспечивают осмотическое давление крови |
| В) α_2 -глобулины | 3) осуществляют транспорт кислорода |
| Г) β -глобулины | 4) осуществляют транспорт гидрофобных молекул (жирные кислоты, билирубин и т.д.) |
| Д) γ -глобулины | 5) осуществляют транспорт тироксина и кортикостероидов |
| | 6) осуществляют транспорт железа |
| | 7) осуществляет транспорт меди |
| | 8) содержат ингибиторы тканевых протеиназ |

7. ПОДБЕРИТЕ ВЕРНЫЕ УТВЕРЖДЕНИЯ ДЛЯ СЛЕДУЮЩИХ ПОНЯТИЙ

- | | |
|------------|---|
| А) ацидоз | 1) сдвиг pH крови в кислую сторону |
| Б) алкалоз | 2) развивается на фоне гипервентиляции легких |
| | 3) сдвиг pH крови в щелочную сторону |
| | 4) развивается на фоне сахарного диабета |

8. ГЕМОГЛОБИН ТРАНСПОРТИРУЕТ ПО КРОВИ

- 1) азот

- 2) углекислый газ
- 3) кислород
- 4) аммиак

9. ГЕМОГЛОБИН ОТНОСИТСЯ К КЛАССУ

- 1) нуклеопротеинов
- 2) фосфопротеинов
- 3) хромопротеинов
- 4) флавопротеинов

10. КАКИЕ ФУНКЦИИ ГЕМОГЛОБИНА НАРУШАЮТСЯ ПРИ СЕРПО-ВИДНОКЛЕТОЧНОЙ АНЕМИИ?

- 1) растворимость
- 2) кооперативность
- 3) снижается сродство гемоглобина к кислороду
- 4) повышается сродство к кислороду
- 5) деформируется эритроцит

11. ПО КАКОМУ ПРИЗНАКУ РАЗДЕЛЯЮТ БЕЛКИ КРОВИ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА?

- 1) по молекулярной массе
- 2) по растворимости в буферных растворах
- 3) по заряду

12. К ГРУППЕ ГЕМОПРОТЕИНОВ ОТНОСЯТСЯ

- 1) миоглобин
- 2) трансферрин
- 3) церулоплазмин
- 4) каталаза

13. КАКИЕ ВИДЫ ГЕМОГЛОБИНОВ СОДЕРЖАТСЯ В ЭРИТРОЦИТАХ ЗДОРОВОГО ЧЕЛОВЕКА

- 1) HbA1
- 2) HbA2
- 3) HbA3
- 4) HbF
- 5) HbC

14. ЭКСКРЕТОРНЫМИ ФЕРМЕНТАМИ НАЗЫВАЮТ

- 1) ферменты, синтезируемые преимущественно в печени в норме, выделяющиеся в кровь и выполняющие определенную функцию
- 2) ферменты, синтезируемые в печени и выделяемые с желчью

- 3) ферменты, синтезируемые в клетках и попадающие в кровь при повреждении тканей
- 4) ферменты, синтезирующиеся в любой ткани
- 5) ферменты, определяемые качественными реакциями

15. СЕКРЕТОРНЫМИ ФЕРМЕНТАМИ НАЗЫВАЮТ

- 1) ферменты, синтезируемые преимущественно в печени в норме выделяющиеся в кровь и выполняющие определенную функцию
- 2) ферменты, синтезируемые в печени и выделяемые с желчью
- 3) ферменты, синтезируемые в клетках и попадающие в кровь при повреждении тканей
- 4) ферменты, синтезирующиеся в любой ткани
- 5) ферменты, определяемые качественными реакциями.

16. ИНДИКАТОРНЫМИ ФЕРМЕНТАМИ НАЗЫВАЮТ

- 1) ферменты, синтезируемые преимущественно в печени, в норме выделяющиеся в кровь и выполняющие определенную функцию
- 2) ферменты, синтезируемые в печени и выделяемые с желчью
- 3) ферменты, синтезируемые в клетках и попадающие в кровь при повреждении тканей
- 4) ферменты, синтезирующиеся в любой ткани
- 5) ферменты, определяемые качественными реакциями

17. ОРГАНОСПЕЦИФИЧНЫЕ ФЕРМЕНТЫ ПЕЧЕНИ

- 1) ЛДГ
- 2) аргиназа
- 3) креатинфосфокиназа
- 4) липаза
- 5) орнитинкарбамойлтрансфераза

18. БЕЛКИ КРОВИ СИНТЕЗИРУЮТСЯ В

- 1) печени
- 2) РЭС
- 3) стенке кишечника
- 4) соединительной ткани

19. КРОВЬ ВЫПОЛНЯЕТ ФУНКЦИИ

- 1) транспортную, осморегулирующую
- 2) буферную, обезвреживающую
- 3) синтетическую, экскреторную
- 4) защитную, иммунологическую
- 5) регуляторную, гомеостатическую

20. КАКИЕ НАРУШЕНИЯ В СТРУКТУРЕ И ФУНКЦИИ ГЕМОГЛОБИНА ИМЕЮТ МЕСТО ПРИ ТАЛАССЕМИИ?

- 1) снижается растворимость гемоглобина
- 2) нарушается синтез одной из цепей гемоглобина
- 3) нарушается кооперативность
- 4) повышается сродство гемоглобина к кислороду

21. В СОСТАВ α_2 - ГЛОБУЛИНОВ ВХОДЯТ

- 1) церулоплазмин
- 2) гаптоглобин
- 3) трансферрин
- 4) гемопексин
- 5) макроглобулин

22. ПРЕАЛЬБУМИНЫ ВЫПОЛНЯЮТ ФУНКЦИИ

- 1) связывание и транспорт гемовой структуры Hb
- 2) связывание и транспорт тироксина
- 3) транспорт ретинолсвязывающего белка
- 4) связывание и транспорт железа и меди

23. β -ГЛОБУЛИНЫ СОДЕРЖАТ

- 1) трансферрин
- 2) гемопексин
- 3) гаптоглобин
- 4) тироксинсвязывающий белок
- 5) С-реактивный белок

24. ОБЕЗВРЕЖИВАЮЩИЕ ФУНКЦИИ КРОВИ ОСУЩЕСТВЛЯЮТСЯ В РЕЗУЛЬТАТЕ

- 1) действия фосфатного и белкового буферов крови
- 2) разведения токсичных веществ
- 3) действия ферментов и плазмы и клеток крови
- 4) связывания токсических веществ альбуминами

25. РЕЗЕРВНЫЙ ГЕМОПРОТЕИН ФЕРРИТИН ОТКЛАДЫВАЕТСЯ В КЛЕТКАХ

- 1) сердца
- 2) печени
- 3) лимфоузлов
- 4) костного мозга
- 5) спинного мозга

26. ФУНКЦИИ ГАПТОГЛОБИНА

- 1) связывание свободного гемоглобина
- 2) обеспечение переноса Fe
- 3) связывает гемовую часть гемоглобина

- 4) ингибирует тканевые протеазы
- 5) транспорт тироксина

27. ФУНКЦИИ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА

- 1) транспорт меди
- 2) ингибитор тканевых протеаз
- 3) транспорт железа
- 4) транспорт гемоглобина
- 5) транспорт ретинола

28. В СОСТАВ АЛЬФА1-ГЛОБУЛИНОВ ВХОДЯТ

- 1) церулоплазмин, гаптоглобин
- 2) альфа-антитрипсин, ингибитор тканевых протеаз
- 3) С-реактивный белок, гемопепсин
- 4) тироксинсвязывающий белок, транскортин

29. ПРИ НЕДОСТАТОЧНОМ БЕЛКОВОМ ПИТАНИИ И СВЯЗАННЫМИ С НИМ «ГОЛОДНЫМИ» ОТЕКАМИ ПРОИСХОДИТ

- 1) нарушение экскреторной функции почек;
- 2) нарушение образования альбуминов в печени
- 3) увеличение ионов натрия в крови
- 4) повышение концентрации общего белка в крови

30. ПОДДЕРЖАНИЕ ОСМОТИЧЕСКОГО ДАВЛЕНИЯ ВНУТРИ СОСУДА ОБЕСПЕЧИВАЕТСЯ

- 1) альбуминами
- 2) катионами натрия
- 3) действием цАМФ
- 4) катионами кальция
- 5) содержанием глюкозы

31. ИСТОЧНИКОМ ЖЕЛЕЗА ДЛЯ СИНТЕЗА ГЕМА ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) цитохромы
- 2) миоглобин
- 3) ферритин
- 4) каталаза
- 5) метионин

32. ВЫБЕРИТЕ СОЕДИНЕНИЯ, КОТОРЫЕ ИСПОЛЬЗУЮТСЯ ДЛЯ СИНТЕЗА ГЕМА

- 1) глицин
- 2) ацетил-КоА
- 3) железо
- 4) гуанидиноацетат
- 5) сукцинил-КоА
- 6) малат

33. КЛЮЧЕВОЙ РЕАКЦИЕЙ В СИНТЕЗЕ ГЕМА, ПО КОТОРОЙ ПРОИСХОДИТ РЕГУЛЯЦИЯ ПРОЦЕССА, ЯВЛЯЕТСЯ
- 1) образование порфобиллиногена
 - 2) образование δ-аминолевулиновой кислоты
 - 3) образование протопорфирина IX
 - 4) присоединение железа с образованием гема
34. К ФЕРМЕНТАМ СВЕРТЫВАЮЩЕЙ СИСТЕМЫ ОТНОСИТСЯ
- 1) V
 - 2) X
 - 3) фосфолипиды
 - 4) VIII
35. ДЕФИЦИТ КАКОГО ФАКТОРА ОТНОСИТСЯ К «ГЕМОФИЛИИ БЕЗ ГЕМОФИЛИИ»
- 1) VII
 - 2) XII
 - 3) XI
 - 4) VIII
36. ВИТАМИН К-ЗАВИСИМЫМИ ФАКТОРАМИ ЯВЛЯЮТСЯ
- 1) VIII, V
 - 2) II, X
 - 3) XII, XI
37. ДЛЯ ОЦЕНКИ ВНУТРЕННЕГО ПУТИ ПРИМЕНЯЮТ
- 1) АПТВ
 - 2) ПТВ
 - 3) ТВ
38. ДЛЯ ОЦЕНКИ ВНЕШНЕГО ПУТИ ПРИМЕНЯЮТ
- 1) АПТВ
 - 2) ПТВ
 - 3) ТВ
39. ДЛЯ ОЦЕНКИ КОНЕЧНОГО ЭТАПА СВЕРТЫВАНИЯ ПРИМЕНЯЮТ
- 1) АПТВ
 - 2) ПТВ
 - 3) ТВ
40. УДЛИНЕНИЕ КАОЛИНОВОГО ВРЕМЕНИ ПРИ НОРМАЛЬНОМ ПТВ И ТВ ХАРАКТЕРИЗУЕТ ДЕФИЦИТ ФАКТОРОВ
- 1) внутреннего пути
 - 2) внешнего пути
 - 3) фибриногена

БИОХИМИЯ НЕРВНОЙ ТКАНИ

Тема 4.1. НЕЙРОМЕДИАТОРЫ И НЕЙРОПЕПТИДЫ

Актуальность

Нейромедиаторы (нейротрансмиттеры) – группа биоактивных соединений, синтезируемых нейронами. Их относят к категории первичных мессенджеров. Нейромедиаторы служат посредниками в передаче нервного импульса через синаптическую щель между нейронами или от нейрона к исполнительной клетке (миоцит, клетка эндокринной железы и др.). В отсутствие нервного импульса молекулы нейромедиаторов хранятся в секреторных пузырьках пресинаптических окончаний аксонов. В ответ на нервный импульс нейромедиаторы освобождаются в пространство синаптической щели, после чего связываются с соответствующими рецепторами постсинаптической мембраны. Если в результате взаимодействия нейромедиатора с рецептором в постсинаптической мембране нейрона возникает потенциал действия, то этот медиатор является возбуждающим. Если потенциал действия не появляется, то такой нейромедиатор относится к категории тормозящих, так как передача нервного импульса прерывается.

По химической природе все нейромедиаторы разделяют на:

- аминокислоты;
- моноамины;
- пептиды.

Аминокислоты

Аминокислоты в нервной ткани не только участвуют в биосинтезе пептидов и белков, но и выполняют функции нейромедиаторов или их предшественников. Особую роль в этом играют дикарбоновые аминокислоты, содержание которых в центральной нервной системе (ЦНС) существенно выше, чем в других тканях.

Тормозящие нейромедиаторы аминокислоты:

- Гамма-аминомасляная кислота (ГАМК). ГАМК синтезируется в ГАМК-шунте, представляющий собой ответвление цикла Кребса. В этом ответвлении происходит декарбоксилирование глутамата. ГАМК важнейший тормозящий нейромедиатор ЦНС человека.

- Глицин. Функционирует, в основном, в спинном мозге. Медиатор уменьшает выделение из нейронов «возбуждающих» аминокислот, таких как глутамат, и усиливает выделение ГАМК.

Возбуждающие нейромедиаторы аминокислоты:

- Глутаминовая кислота (глутамат). Единственным источником необходимого количества глутамата в нейронах является глутамат-глутаминовый цикл. Глутаминовая кислота (глутамат) участвует в передаче информации, связанной с сенсорикой, движением и памятью. Действует, в основном, в нейронах мозжечка и спинного мозга. Глутамат также является источником нейромедиатора ГАМК, обладающего тормозящим действием.

- Аспарагиновая кислота. Функционирует в нейронах коры головного мозга.

Моноамины

- Норадреналин. Образуется в клетках ЦНС из незаменимой аминокислоты тирозина. С участием фермента тирозин-3-гидроксилазы тирозин превращается в 3,4-дигидроксифенилаланин (ДОФА). ДОФА декарбоксилируется до дофамина. Норадреналин – «медиатор бодрствования».

- Дофамин – один из химических факторов «системы поощрения», вырабатывается при получении позитивного опыта, влияет на процессы мотивации и обучения.

- Серотонин гидроксипроизводное триптофана. Обладает антидепрессивным, обезболивающим эффектом. Производным серотонина является другое биологически активное вещество – мелатонин, обеспечивающее тормозное, снотворное действие.

- Ацетилхолин. Нейромедиатор вырабатывается в нейромышечных синапсах и отвечает за произвольные движения. Ацетилхолин вовлечен также в регуляцию активности вегетативной нервной системы. Нейромедиатор оказывает как расслабляющее воздействие (сужение зрачков и бронхов, замедление сердцебиения), так и стимулирует работу органов (активизирует работу желудочно-кишечного тракта).

Нейропептиды

Группа нейропептидов (НП) включает в себя малые и средние по размеру пептиды, в основном состоящих из 50–60 аминокислотных остатков. НП образуются в результате лимитированного протеолиза больших пептидов-предшественников. По сравнению с «классическими» медиаторами, осуществляющими межклеточную сигнализацию в ЦНС, система НП оказалась гораздо более многочисленной (открыто более тысячи НП) и полифункциональной. В различных отделах ЦНС и нейронах с различной специализацией, содержатся качественно различные «комплекты» НП.

Многие НП выполняют, в том числе, функции нейромедиаторов – передают сигнал в пределах синапсов, подобно «классическим» медиаторам непептидной природы. Показана возможность присутствия в одних и тех же секреторных везикулах нервного окончания определённых комбинаций непептидного медиатора с несколькими НП. В зависимости от частоты и длительности нервной импульсации эти соединения могут выделяться в синаптическую щель совместно, либо раздельно. На этом основании НП называют конейромедиаторами. Наряду с передачей сигнала в пределах синапса, НП могут осуществлять передачу информации на более значительные расстояния – в небольших зонах ЦНС или даже в пределах организма. В этом случае их функции сопоставимы с функциями гормонов (гистогормонов).

4.1.1. Общая характеристика иммуноферментного метода

Методы иммунного анализа широко используются в медицинской практике с диагностической и аналитической целями. Иммунный анализ основывается на взаимодействии антигена (АГ) и антитела (АТ) с использованием различных вариантов мечения одного из компонентов (фермент, радионуклид, флуоресцентный краситель и другие). Оценка реакции проводится автоматически на специальной аппаратуре, что позволяет стандартизировать эти методы.

В зависимости от типа используемой метки и условий постановки теста иммунный анализ обозначается как иммуноферментный (ИФА), радиоиммунный (РИА), иммунофлуоресцентный и другие. При постановке реакций в один или несколько этапов они обозначаются как прямые или непрямые. Имеет значение среда, в которой проводится реакция. Если реакция проводится с реагентами, фиксированными на поверхности, то тест обозначается как твердофазный, например, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay).

В основе иммуноферментного метода лежит специфическое «узнавание» анализируемого вещества специфическим к нему антителом (рис. 14).

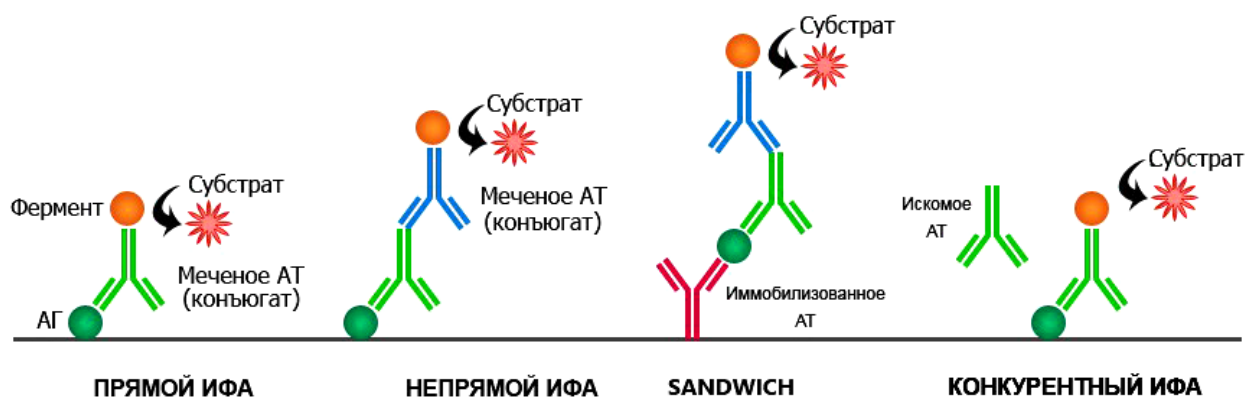


Рис. 14. Схема иммуноферментного анализа

Использование ферментов в иммуноферментном анализе заключается в том, что молекула фермента, соединённая с антигеном или антителом, служит индикатором реакции антиген-антитело в среде. Измеряя активность фермента, можно оценить, сколько молекул антигена вступило в иммунохимическую реакцию с антителом.

Одним из путей визуализации образования комплекса антиген-антитело является использование меченых соединений, в которых метка может легко определяться в концентрациях, сопоставимых с определяемой концентрацией анализируемого вещества. В иммуноферментном анализе в качестве такой метки индикации используют ферменты: пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу из кишечника телят и *E.coli*. Возможность применения ферментов в качестве метки в иммунном анализе обусловлена, прежде всего, их высокой каталитической активностью, позволяющей с применением соответствующих субстратов регистрировать ферменты в растворе на уровне 10^{-15} М и ниже. Ферменты связаны ковалентно с антителами и при добавлении их в систему соответствующих субстратов (хромогенные субстраты) катализируют образование окрашенных продуктов. Среди хромогенных субстратов для пероксидазы наибольшее распространение получили о-фенилендиамин и 3,3',5,5'-тетраметилбензидин.

К настоящему времени разработано большое число различных вариантов проведения иммуноферментного анализа, имеющих как принципиальные отличия, так и второстепенные. Обычно методы иммуноферментного анализа различают по принципу проведения всех стадий анализа – с участием твердой фазы (гетерогенные методы) или же только в растворе (гомогенные методы).

Методы иммуноферментного анализа применимы для контроля лекарственной терапии, препаратов, влияющих на сердечно-сосудистую систему, антибиотиков, барбитуратов, кодеина, морфина. Эти методы позволяют выявлять наличие психотропных препаратов в организме, наркотиков. Иммуноферментный анализ используется в контроле биотехнологических процессов и качества лекарственных препаратов. Так, в микробиологических производствах иммуноферментный анализ может применяться для выявления высокоэффективных микроорганизмов – продуцентов биологически активных веществ (антибиотиков, ферментов и т. д.). Иммуноферментный анализ может также использоваться для контроля появления посторонних микроорганизмов, бактериофагов в ферментерах. Иммуноферментный анализ применим для определения содержания гормонов, белков и метаболитов (тиреотропный гормон, тироксин, тиреоглобулин, кортизол, прогестерон, тестостерон, фибронектин, α -фетопротеин, тропонин I, неоптерин, иммуноглобулины, фолиевая кислота, витамин B12 и др.), для выявления возбудителей инфекций (хламидиоз, микоплазмоз, герпес, гепатиты А, В и С, кандидоз, цитомегаловирус, краснуха, сифилис, ВИЧ, и др.), паразитов (описторхоз, лям-

блиоз), а также для контроля лекарственной терапии (антибиотики, барбитураты, кодеин, морфин).

4.1.2. Определение содержания серотонина в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа

Серотонин относится к биогенным аминам, метаболизм сходен с метаболизмом катехоламинов. Нейромедиатор и гормон, участвует в регуляции памяти, сна, поведенческих и эмоциональных реакциях, контроле кровяного давления, терморегуляции, пищевых реакциях. Образуется в серотонинэргических нейронах, эпифизе, а также энтерохромаффировых клетках желудочно-кишечного тракта. 95% серотонина в человеческом организме локализовано в кишечнике, это основной источник серотонина крови. В крови он содержится преимущественно в тромбоцитах, которые захватывают серотонин из плазмы. Серотонин участвует в патогенезе заболеваний желудочно-кишечного тракта, в частности, карциноидного синдрома и синдрома раздраженного кишечника. Определение концентрации серотонина в крови в клинической практике используют преимущественно в диагностике карциноидных опухолей брюшной полости (тест положителен в 45% случаев карциноида прямой кишки). Исследование серотонина крови целесообразно использовать в комплексе с определением экскреции метаболита серотонина (5-HIAA) с мочой.

Принцип метода

Основан на твердофазном конкурентном варианте иммуноферментного анализа. На поверхности лунок планшета (твердой фазе) иммобилизованы молекулы антигена. Молекулы ацилированного серотонина, содержащиеся в стандартах, контролях и исследуемых образцах, и молекулы, иммобилизованные на твердой фазе, конкурируют за ограниченное число центров связывания специфичных антител. После того, как реакция связывания достигнет равновесия, несвязавшиеся с твердой фазой антигены и комплексы «антиген-антитело» удаляются промывкой. Антитела, связавшиеся с иммобилизованным на твердой фазе антигеном, выявляются с помощью конъюгата – антител к IgG кролика, меченных пероксидазой. В качестве субстрата используется тетраметилбензидин (ТМБ). Интенсивность цветовой реакции измеряют при длине волны 450 нм. Количество серотонина в исследуемых образцах рассчитывается по калибровочной кривой, построенной по известным концентрациям в стандартах.

Реактивы:

1. *Промывочный буфер*: разведите 20 мл Концентрата промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл. Храните разведенный буфер при температуре 2–8 °С в течение 6 мес.

2. *Ацилирующий реагент* (BA E-8912) имеет температуру замерзания 18,5 °С. Поэтому перед проведением анализа необходимо прогреть его до комнатной температуры и убедиться, что он находится в жидком состоянии и представляет собой гомогенный, не содержащий кристаллов раствор. Альтернативным вариантом может быть хранение Ацилирующего реагента при комнатной температуре (20–25 °С), отдельно от других компонентов набора (см. раздел 2).

Проведение анализа

Подготовка образцов и их ацилирование

1. Внесите в соответствующие Реакционные пробирки по 25 мкл стандартов, контролей и образцов сыворотки крови, мочи или тромбоцитов.
2. Внесите во все пробирки по 500 мкл ацилирующего буфера.
3. Внесите во все пробирки по 25 мкл ацилирующего реагента.
4. Тщательно перемешайте содержимое Реакционных пробирок и инкубируйте в течение 15 мин при комнатной температуре (20–25 °С). *Внимание!* Отберите по 25 мкл подготовленных стандартов, контролей и образцов для определения серотонина.

Иммуноферментный анализ

1. Внесите в соответствующие лунки планшета с иммобилизованным серотонином по 25 мкл ацилированных стандартов А–F, контролей и исследуемых образцов.
2. Внесите во все лунки по 100 мкл антисыворотки к серотонину.
3. Инкубируйте в течение 30 мин при комнатной температуре (20–25 °С) на орбитальном шейкере (около 600 об./мин).
4. Удалите содержимое лунок и тщательно промойте 3 раза, добавляя по 300 мкл разведенного Промывочного буфера в каждую лунку. После цикла промывки удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом по впитывающей бумаге.
5. Внесите во все лунки по 100 мкл ферментного конъюгата.
6. Инкубируйте в течение 15 мин при комнатной температуре (20–25° С) на орбитальном шейкере (около 600 об./мин).
7. Удалите содержимое лунок и тщательно промойте 3 раза, добавляя по 300 мкл разведенного Промывочного буфера в каждую лунку. После цикла промывки удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом по впитывающей бумаге.
8. Внесите во все лунки по 100 мкл субстрата.
9. Инкубируйте в течение 15±2 мин при комнатной температуре (20–25 °С) на орбитальном шейкере (около 600 об./мин) в темноте.
10. *Внимание!* Избегайте воздействия прямых солнечных лучей!

11. Добавьте во все лунки по 100 мкл стоп-реагента (в той же последовательности и с той же скоростью, что и субстрат) и встряхните планшет для обеспечения гомогенного распределения раствора.

12. Измерьте оптическую плотность раствора не позже, чем через 10 мин с момента внесения стопреагента при помощи планшетного спектрофотометра при длине волны 450 нм и референсной длине волны 620–650 нм.

Расчет результатов

Стандарт	Концентрации стандартов					
	A	B	C	D	E	F
Серотонин (нг/мл)	0	15	50	150	500	2500
Серотонин (нмоль/л)	0	85,1	284	851	2840	14175
Перевод единиц	Серотонин (нг/мл) × 5,67 = серотонин (нмоль/л)					

Рассчитать среднюю оптическую плотность каждого стандарта, контроля или исследуемого образца. На миллиметровой бумаге построить калибровочную кривую зависимости средней оптической плотности стандартов (по оси Y) от \log концентрации серотонина в стандартах в нг/мл (по оси X). По калибровочной кривой рассчитать концентрации серотонина в контролях и исследуемых образцах, сопоставляя значения их средней оптической плотности с соответствующими концентрациями анализата.

Референтные значения

	Серотонин	
	Сыворотка крови	Женщины 80 – 450 нг/мл
Моча	50 – 250 мкг/день	
Серотонин тромбоцитов	215 – 850 нг/10 ⁹ тромбоцитов	

СЕМИНАР

«Биохимические механизмы и физиологические эффекты биоактивных веществ»

1. Особенности липидного состава мембран нейронов. Строение и функции ганглиозидов и галактоцереброзидов.
2. Строение миелиновых оболочек и их функции. Механизм сальтаторной проводимости в миелиновых волокнах.
3. Специфические белки мембран нейронов: транспортные АТФ-азы, пермеазы, лиганд-управляемые и потенциал-чувствительные ионные каналы. Строение, механизмы работы и выполняемые функции.
4. Гемато-энцефалический барьер. Морфология и функции. Значение относительной автономности метаболизма клеток ЦНС.

5. Механизмы транспорта через гемато-энцефалический барьер углеводов, липидов, аминокислот и белково-пептидных молекул. Особенности транспорта.
6. Роль аминокислот глутамата, глутамина, аспарагиновой кислоты и гамма-аминомасляной кислоты в метаболизме нервной ткани.
7. Роль глутамата (глутаминовой кислоты) в метаболизме нервной ткани.
8. Ароматические аминокислоты, как источники для нервной ткани серотонина, дофамина, и катехоламинов. Механизмы их синтеза и выполняемые функции.
9. Нейроспецифические белки ЦНС: белок S-100, белок В-50, кальций-нейрин и фодрин. Характеристика этих белков и выполняемые функции.
10. Глутамат-глутаминовый цикл. Основные этапы, компартементализация, ферменты и транспортеры его промежуточных метаболитов. Биологические функции глутамат-глутаминового цикла.
11. ЦНС, как одна из наиболее метаболически активных систем организма. Характеристики процессов, являющихся ведущими потребителями АТФ в нейронах.
12. Особенности биоэнергетики ЦНС. Глюкоза – ведущий субстрат окисления. Роль кетоновых тел в обеспечении энергией клеток нервной ткани.

Тестовые задания

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. ВЫБЕРИТЕ ИЗ СПИСКА ЛИПИДЫ, ЧЬЯ МАССОВАЯ ДОЛЯ НАИБОЛЕЕ ВЕЛИКА В КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАНАХ НЕРВНОЙ ТКАНИ ПО СРАВНЕНИЮ С ДРУГИМИ КЛЕТКАМИ
 - 1) фосфолипиды
 - 2) ганглиозиды
 - 3) эфиры холестерола
 - 4) галактоцереброзиды
 - 5) сфинголипиды
2. ВЫБЕРИТЕ ИЗ СПИСКА КЛЕТКИ, КОТОРЫЕ УЧАСТВУЮТ В ФОРМИРОВАНИИ ГЕМАТО-ЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА
 - 1) перициты
 - 2) эндотелиальные клетки
 - 3) олигодендроциты
 - 4) микроглия
 - 5) астроциты

3. ВЫБЕРИТЕ ИЗ СПИСКА МОЛЕКУЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ПРОНИКАЮТ ЧЕРЕЗ ГЕМАТО-ЭНЦЕФАЛИЧЕСКИЙ БАРЬЕР
- 1) глюкоза
 - 2) длинноцепочечные жирные кислоты
 - 3) короткоцепочечные жирные кислоты
 - 4) аминокислоты
 - 5) пептиды и пептидные гормоны
4. УКАЖИТЕ АМИНОКИСЛОТЫ, СОДЕРЖАНИЕ КОТОРЫХ В ЦНС НАИБОЛЕЕ ВЕЛИКО
- 1) аланин
 - 2) глутамин
 - 3) глутамат
 - 4) аспарагиновая кислота
 - 5) гамма-аминомасляная кислота
5. КОТОРЫЙ ИЗ ПУНКТОВ СПИСКА НЕ ОТРАЖАЕТ ФУНКЦИИ ГЛУТАМАТА В НЕРВНОЙ ТКАНИ?
- 1) является прекурсором (предшественником) гамма-аминомасляной кислоты
 - 2) участвует в дазаминировании других аминокислот
 - 3) является возбуждающим нейромедиатором
 - 4) участвует в функционировании цикла Кори
 - 5) участвует в синтезе глутатиона
6. ВИТАМИН В6 ЯВЛЯЕТСЯ ПРЕДШЕСТВЕННИКОМ КОФЕРМЕНТА ДЛЯ
- 1) цитратлиазы
 - 2) цитратсинтазы
 - 3) глутаматдекарбоксилазы
 - 4) ГАМК-трансаминазы
 - 5) дегидрогеназы янтарного полуальдегида
7. ВЫБЕРИТЕ ИЗ СПИСКА БИМОЛЕКУЛЫ, ИСТОЧНИКОМ КОТОРЫХ В ЦНС ЯВЛЯЮТСЯ АРОМАТИЧЕСКИЕ АМИНОКИСЛОТЫ
- 1) серотонин
 - 2) секвестрин
 - 3) дофамин
 - 4) таурин
 - 5) катехоламины
8. УКАЖИТЕ БЕЛОК, КОТОРЫЙ НЕ ОТНОСИТСЯ К НЕЙРОСПЕЦИФИЧЕСКИМ Ca^{2+} -СВЯЗЫВАЮЩИМ БЕЛКАМ
- 1) белок S-100
 - 2) кальцийнейрин

- 3) белок В-50
- 4) грелин
- 5) фодрин

9. УКАЖИТЕ МОЛЕКУЛЫ, ОКИСЛЕНИЕ КОТОРЫХ ОБЕСПЕЧИВАЕТ ОСНОВНОЙ ВКЛАД В СИНТЕЗ АТФ В НЕРВНОЙ ТКАНИ

- 1) глюкоза
- 2) длинноцепочечные жирные кислоты
- 3) кетоновые тела
- 4) ароматические аминокислоты
- 5) глутамат

10. КАКИЕ ИЗ ПЕРЕЧИСЛЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ, НЕ ОТНОСЯТСЯ К ВОЗБУЖДАЮЩИМ НЕЙРОМЕДИАТОРАМ?

- 1) глутамат
- 2) глицин
- 3) катехоламины
- 4) серотонин

ТВОРЧЕСКИЕ ЗАДАНИЯ

К занятию «**Энергетический обмен в мышечных тканях**»

1. Энергообеспечение мышечной деятельности
2. Биохимический контроль при занятиях физической культурой
3. Связь энергообеспечения организма с уровнем тренированности и утомления
4. Биохимия энергообеспечения организма и уровня утомления-восстановления организма
5. Биохимические основы силы, быстроты и выносливости
6. Изменение физической работоспособности с возрастом
7. Биохимические основы рационального питания спортсменов

К занятию «**Биохимические механизмы и физиологические эффекты биоактивных веществ**»

1. Биохимия памяти.
2. Белки мозга.
3. Белки миелиновой оболочки.
4. Энергетический обмен головного мозга.
5. Нейромедиаторы и нейрогормоны.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К ЗАЧЁТУ

1. Детоксикационная функция печени. Этапы обезвреживания ксенобиотиков.
2. Стадии синтеза и распада гема.
3. Порфирии. Диагностика.
4. Строение коллагена и эластина. Особенности.
5. Адгезивные и антиадгезивные белки.
6. Маркеры синтеза кости.
7. Маркеры остеопороза.
8. Современные представления о фиброзе печени.
9. Методы оценки системы гемостаза.
10. Метаболические различия быстрых и медленных моторных единиц.
11. Энергетическая емкость различных путей ресинтеза АТФ в работающей мышце.
12. Метаболизм кальция в скелетных, гладких и сердечной мышце. Значение.
13. Особенности биохимии нервной ткани.
14. Характеристика энергетического обмена нервной ткани.

ОТВЕТЫ НА ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Раздел 1 БИОХИМИЯ ПЕЧЕНИ

Номер задания	Номер ответа	Номер задания	Номер ответа	Номер задания	Номер ответа
1	3,4,5,8,1,2,7,6	12	1,3,5	23	3,4
2	2,4,1,7,6	13	2	24	1,3,5
3	3,2,6,4,5,1	14	2,4,5	25	1,3,4
4	5,3,2,4,1	15	1,2,4	26	1,3,5
5	A-3,7, B-1,246, C-5,8	16	2,4	27	3
6	A-1,2,4,6, B- 3,5	17	2,4	28	2,3,5
7	2,4,6	18	2,5	29	2,3,5
8	1,5,6	19	3,5	30	2
9	3,5	20	3,5	31	1,4,5
10	3,5	21	1,4,5	32	2
11	24	22	4		

Раздел 2 БИОХИМИЯ МЫШЦ

Номер задания	Номер ответа	Номер задания	Номер ответа	Номер задания	Номер ответа
1	3,2,1,4,5	9	1,3,4	17	1,3
2	2,4,3,5,1	10	1,2,3	18	1,3
3	3,2,4,1	11	2,3	19	1,4
4	A-6,8, B-1,4,5, B-2,3,7	12	1,4	20	1,2
5	A-1,6,7, B-4,5,8	13	2,3	21	2,5
6	A-1,2,6,7, B-3,4,5	14	1	22	2,5
7	A-1,3,7, B-2,5,6, B-4,8,9	15	2	23	2
8	1,3	16	2,4	24	1,3

Раздел 3

БИОХИМИЯ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

Тема 1. БИОХИМИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА

Номер задания	Номер ответа	Номер задания	Номер ответа	Номер задания	Номер ответа
1	2→1→5→3→4	14	2,5	27	3
2	3→2→1→4	15	2,3	28	3,4,7
3	А-3,4,5; Б-1,2,6	16	2	29	2
4	А-1,3; Б-2,6	17	2	30	3,4
5	А-1,5; Б-2,3; В-4,6,7	18	1,4,5,6	31	4,5
6	1-А; 2,3-Б; 4-В	19	4	32	2
7	А-4,5; Б-1,3; В-2,6,7	20	1	33	1,5
8	А-3,7; Б-1,2,4,5,6	21	4	34	2
9	1,2,4,5,6	22	2	35	2,4
10	1,3,4	23	2,4	36	2
11	1	24	2,3	37	2
12	2,3,6	25	1	38	2
13	3	26	3		

Тема 2. БИОХИМИЯ КРОВИ

Номер задания	Номер ответа	Номер задания	Номер ответа	Номер задания	Номер ответа
1	2→1→3	15	1	29	2,3
2	2→1→3→4	16	3	30	1,2
3	А-2; Б-3	17	2,5	31	3
4	А-1; Б-2	18	1,2	32	1,3,5
5	А-1,3; Б-1,4	19	1,2,4,5	33	2
6	А-2,4; Б-5,8; В-7,8; Г-6	20	2,3	34	2
7	А-1,4; Б-2,3	21	1,2	35	4
8	2,3	22	2,3	36	2
9	3	23	1,2	37	1
10	1,3,5	24	2,4	38	2
11	1,3	25	2,4	39	3
12	1,4	26	1	40	1
13	1,2,4	27	1		
14	2	28	2,4		

Тема 3. БИОХИМИЯ ЖИРОВОЙ ТКАНИ

Номер задания	Номер ответа	Номер задания	Номер ответа
1	3,5	7	2
2	4	8	1
3	3,5	9	1
4	1, 4	10	3
5	4	11	4
6	4	12	4

Раздел 4 **БИОХИМИЯ НЕРВНОЙ ТКАНИ**

Номер задания	Номер ответа	Номер задания	Номер ответа
1	2,4	6	3
2	1,2,5	7	1,3,5
3	2	8	4
4	2,3,4,5	9	1,3
5	4	10	2

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Биохимия [Электронный ресурс]: учебник / под ред. Е. С. Северина. – 5-е изд., испр. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. – 768 с. – Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru>
2. Биологическая химия с упражнениями и задачами [Электронный ресурс]: учебник / под ред. С. Е. Северина. – 2-е изд., испр. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. – 624 с.: ил. – Режим доступа: <http://www.studmedlib.ru>
3. Кольман, Я. Наглядная биохимия / Я. Кольман, К.-Г. Рём ; пер. с англ. Т. П. Мосоловой. – 5-е изд., перераб. и доп. – М. : Лаборатория знаний, 2018. – 509 с.
4. Кузьменко, Д. И. Биохимия органов и систем: курс лекций [Электронный ресурс] / Д. И. Кузьменко, О. Е. Акбашева, Т. К. Климентьева. – Томск: СибГМУ, 2019 – 241 с. – Режим доступа: <http://irbis64.medlib.tomsk.ru>
5. Трудные вопросы биохимии. Избранные лекции по общей и частной биохимии: учебное пособие / под ред. Т. С. Федоровой В. Ю. Сереброва. В 2. Ч. – Ч. 1. – Томск: СибГМУ, 2006. – 318 с.

Учебное издание

**Ольга Евгеньевна Абашева
Дмитрий Иванович Кузьменко
Татьяна Константиновна Климентьева
Денис Александрович Дьяков
Ольга Геннадиевна Шитикова
Евгения Викторовна Кайгородова**

РУКОВОДСТВО К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ ПО БИОХИМИИ ОРГАНОВ И СИСТЕМ

для студентов медико-биологического факультета

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

Редактор А.Ю. Коломийцев
Технический редактор О.В. Коломийцева
Обложка С.Б. Гончаров

Издательство СибГМУ
634050, г. Томск, пр. Ленина, 107
Тел. 8(382-2) 51-41-53
E-mail: otd.redaktor@ssmu.ru

Подписано в печать 08.07.2021 г.
Формат 60x84 ¹/₁₆. Бумага офсетная.
Печать цифровая. Гарнитура «Times». Печ. лист 5,9. Авт. лист. 3,5.
Тираж 100 экз. Заказ № 25

Отпечатано в Издательстве СибГМУ
634050, Томск, ул. Московский тракт, 2
E-mail: lab.poligrafii@ssmu.ru