

Государственное образовательное учреждение высшего  
профессионального образования  
«Сибирский государственный медицинский университет  
Федерального агентства по здравоохранению  
и социальному развитию»

# Лабораторный практикум по биологической химии

для студентов фармацевтического факультета

Учебное пособие

под редакцией  
Профессора В.Ю.Сереброва  
Профессора Т.С.Федоровой

"Рекомендовано Учебно-методическим объединением по  
медицинскому и фармацевтическому образованию вузов России в  
качестве учебного пособия для студентов, обучающихся по  
специальности 06010865 – Фармация"

Томск  
Сибирский государственный медицинский университет  
2009

УДК 577.1:615.01(075.8)  
ББК Е072Я7 + Р282Я7  
Л125

Рецензенты:

Заведующий кафедрой биохимии Иркутского государственного медицинского университета, доктор медицинских наук, профессор **В.И.Кулинский**

Заведующий кафедрой биологической химии Новосибирского государственного медицинского университета, доктор медицинских наук, профессор **В.И.Шарапов**

Авторы

Позднякова И.А., Иванов В.В., Канская Н.В., Тимин О.А., Колесова Н.И.

Лабораторный практикум по биологической химии для студентов фармацевтического факультета. Учебное пособие. / И.А.Позднякова, В.В.Иванов, Н.В.Канская, О.А.Тимин, Н.И.Колесова / под ред. проф. Сереброва В.Ю. и проф. Федоровой Т.С. – Томск: Сибирский государственный медицинский университет, 2009. – 250 с.

Учебное пособие предназначено для обучения студентов фармацевтических факультетов. В данном пособии в соответствии с темами приведены рекомендуемые лабораторные работы, используемые в фармации при стандартизации и контроле качества лекарств, а также методы определения продуктов биотрансформации при исследовании метаболизма ксенобиотиков. Изложено практическое применение иммунохимических методов анализа и ДНК-технологий в фармации и медицине. Указаны преимущества и перспективные направления использования иммобилизованных ферментов.

Пособие предназначено для проведения практических занятий. Материал соответствует программе обучения и плану практических занятий по курсу биологической химии на фармацевтическом факультете.

Учебное пособие утверждено и рекомендовано к печати: учебно-методической комиссией фармацевтического факультета (протокол №1 от 02 октября 2008) и Центральным методическим советом (протокол № 8 от 29 декабря 2008) ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава.

ISBN

© Сибирский государственный медицинский университет, 2009

© И.А.Позднякова, В.В.Иванов, Н.В.Канская, О.А.Тимин, Н.И.Колесова, 2009

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ .....	3
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	8
ВВЕДЕНИЕ .....	9
РАЗДЕЛ 1. СТРОЕНИЕ, СВОЙСТВА И ФУНКЦИИ БЕЛКОВ.....	10
ТЕМА 1.1. СТРОЕНИЕ И КЛАССИФИКАЦИЯ АМИНОКИСЛОТ .....	10
Лабораторная работа 1 Цветные реакции на белки и аминокислоты.....	11
Лабораторная работа 2 Исследование наличия белка и свободных аминокислот в биологическом материале .....	14
ТЕМА 1.2. КЛАССИФИКАЦИЯ И ФУНКЦИИ БЕЛКОВ В ОРГАНИЗМЕ.....	15
Лабораторная работа 1 Выделение и анализ химического состава сложных белков .....	16
ТЕМА 1.3. СТРОЕНИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ .....	19
Лабораторная работа 1 Высаливание белков .....	20
Лабораторная работа 2 Исследование денатурации белков .....	21
ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ДЕНАТУРИРУЮЩИХ АГЕНТОВ В МЕДИЦИНЕ .....	23
ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ПО РАЗДЕЛУ "СТРОЕНИЕ, СВОЙСТВА И ФУНКЦИИ БЕЛКОВ".....	23
РАЗДЕЛ 2. СТРОЕНИЕ, КЛАССИФИКАЦИЯ И РОЛЬ ВИТАМИНОВ .....	27
ТЕМА 2.1. ЖИРОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ.....	28
Лабораторная работа 1 Качественные реакции на жирорастворимые витамины.....	29
Лабораторная работа 2 Обнаружение жирорастворимых витаминов в пищевых источниках.....	31
Практическое применение жирорастворимых витаминов.....	31
ТЕМА 2.2. ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ .....	32
Лабораторная работа 1 Качественные реакции на водорастворимые витамины.....	33
Лабораторная работа 2 Количественное определение содержания витамина С в биологических объектах.....	36
ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ В МЕДИЦИНЕ .....	39
СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ ПО РАЗДЕЛУ «СТРОЕНИЕ, КЛАССИФИКАЦИЯ И РОЛЬ ВИТАМИНОВ» .....	40
РАЗДЕЛ 3. ФЕРМЕНТЫ.....	43
ТЕМА 3.1. СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ .....	43
Лабораторная работа 1 Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры .....	44
Лабораторная работа 2 Специфичность действия ферментов.....	45
Лабораторная работа 3 Влияние активаторов и ингибиторов на активность амилазы .....	47
ТЕМА 3.2. КЛАССИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ.....	48
Лабораторная работа 1 Качественные реакции обнаружения ферментов в биологических объектах .....	55

Лабораторная работа 2 Количественное определение активности ферментов.....	57
ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ В МЕДИЦИНЕ И ФАРМАЦИИ .....	60
ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ПО РАЗДЕЛУ «ФЕРМЕНТЫ» .....	65
РАЗДЕЛ 4. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ .....	69
ТЕМА 4.1. СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ .....	69
Лабораторная работа 1 Спектрофотометрический метод определения концентрации нуклеиновых кислот и чистоты репарата ДНК (по А.С. Спирина).....	70
ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ПО РАЗДЕЛУ «НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ» .....	73
РАЗДЕЛ 5. ВИДЫ ПЕРЕНОСА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ .....	77
ТЕМА 5.1. МАТРИЧНЫЕ БИОСИНТЕЗЫ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И БЕЛКА .....	77
Лабораторная работа 1 Количественное определение белка микробиуретовым методом Ицаки-Гилла .....	79
Лабораторная работа 2 Количественное определение белка рефрактометрическим методом .....	79
ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ДНК-ТЕХНОЛОГИЙ В ФАРМАЦИИ И МЕДИЦИНЕ .....	82
ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ПО РАЗДЕЛУ «ВИДЫ ПЕРЕНОСА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ» .....	85
РАЗДЕЛ 6. ИММУНОБИОХИМИЯ.....	87
ТЕМА 6.1. БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ИММУНИТЕТА.....	87
ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ИММУНОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ АНАЛИЗА В МЕДИЦИНЕ И ФАРМАЦИИ.....	88
ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ПО РАЗДЕЛУ «ИММУНОБИОХИМИЯ».....	93
РАЗДЕЛ 7. БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ.....	95
ТЕМА 7.1. СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН .....	95
Лабораторная работа 1 Количественное определение малонового диальдегида в гомогенате печени крыс.....	96
ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ПО РАЗДЕЛУ «БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ» .....	98
РАЗДЕЛ 8. ВВЕДЕНИЕ В ОБМЕН ВЕЩЕСТВ И ЭНЕРГИИ. ....	100
ТЕМА 8.1. БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ .....	100
ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ПО РАЗДЕЛУ «ВВЕДЕНИЕ В ОБМЕН ВЕЩЕСТВ И ЭНЕРГИИ».....	101
РАЗДЕЛ 9. ОБМЕН И ФУНКЦИИ УГЛЕВОДОВ.....	103
ТЕМА 9.1. СТРОЕНИЕ И ВНЕШНИЙ ОБМЕН УГЛЕВОДОВ .....	103
Лабораторная работа 1 Исследование влияния амилазы на крахмал и целлюлозу .....	104
Лабораторная работа 2 Качественные реакции на глюкозу в моче .....	106
ТЕМА 9.2. АНАЭРОБНЫЕ ПУТИ ПРЕВРАЩЕНИЯ УГЛЕВОДОВ В КЛЕТКАХ.....	108
Лабораторная работа 1 Анаэробный гликолиз в мышечной ткани.....	109
Лабораторная работа 2 Обнаружение молочной кислоты в мышечной ткани с помощью реакции Уффельмана.....	111
ТЕМА 9.3. АЭРОБНЫЕ ПУТИ ПРЕВРАЩЕНИЯ УГЛЕВОДОВ.....	112
Лабораторная работа 1 Количественное определение глюкозы в сыворотке крови глюкозооксидазным методом.....	113

Лабораторная работа 2 Влияние сахарной нагрузки на содержание глюкозы в крови (глюкозо-толерантный тест).....	116
ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ПО РАЗДЕЛУ «ОБМЕН И ФУНКЦИИ УГЛЕВОДОВ».....	120
СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ ПО разделу «ОБМЕН И ФУНКЦИИ УГЛЕВОДОВ».....	122
РАЗДЕЛ 10. ОБМЕН И ФУНКЦИИ ЛИПИДОВ.....	124
ТЕМА 10.1. СТРОЕНИЕ И ВНЕШНИЙ ОБМЕН ЛИПИДОВ.....	124
Лабораторная работа 1 Исследование действия липазы поджелудочной железы. Влияние желчи на активность липазы.....	125
Лабораторная работа 2 Качественная реакция на желчные кислоты (реакция Петтенкофера).....	126
Лабораторная работа 3 Определение кислотного числа жира.....	126
ТЕМА 10.2. ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ ТРИАЦИЛГЛИЦЕРИНОВ.....	127
Лабораторная работа 1 Количественное определение концентрации общих липидов в сыворотке сульфованилиновым методом.....	129
ТЕМА 10.3. ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ОБМЕН СЛОЖНЫХ ЛИПИДОВ.....	130
Лабораторная работа 1 Обнаружение фосфатидилхолина (лецитина) в яичном желтке.....	131
Лабораторная работа 2 Определение общего холестерина в сыворотке крови ферментативным методом.....	132
Лабораторная работа 3 Определение в сыворотке крови холестерина ЛПВП, холестерина ЛПНП+ЛПОНП, индекса атерогенности.....	133
Лабораторная работа 4 Определение кетоновых тел и глюкозы в моче.....	134
ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ПО РАЗДЕЛУ «ОБМЕН И ФУНКЦИИ ЛИПИДОВ»..	137
СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ ПО РАЗДЕЛУ «ОБМЕН И ФУНКЦИИ ЛИПИДОВ».....	140
РАЗДЕЛ 11. ОБМЕН БЕЛКОВ.....	142
ТЕМА 11.1. ПЕРЕВАРИВАНИЕ ПРОСТЫХ БЕЛКОВ В ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОМ ТРАКТЕ.....	142
Лабораторная работа 1 Определение свободной соляной кислоты в желудочном соке.....	143
Лабораторная работа 2 Определение общей кислотности, свободной и связанной соляной кислоты в одной порции желудочного сока.....	145
Лабораторная работа 3 Обнаружение молочной кислоты в желудочном соке (реакция Уффельмана).....	148
Лабораторная работа 4 Обнаружение кровяных пигментов в желудочном соке.....	149
Лабораторная работа 5 Беззондовый метод определения кислотности желудочного сока (ацидотест).....	150
ТЕМА 11.2. ОСНОВНЫЕ ПУТИ МЕТАБОЛИЗМА АМИНОКИСЛОТ В КЛЕТКЕ.....	151
Лабораторная работа 1 Определение активности аминотрансфераз сыворотки крови.....	152
ТЕМА 11.3. ОБЕЗВРЕЖИВАНИЕ АММИАКА В ОРГАНИЗМЕ.....	154
Лабораторная работа 1 Диацетилмонооксимный метод определения содержания мочевины в сыворотке крови и моче.....	155
Лабораторная работа 2 Определение содержания креатинина в моче...	156

ТЕМА 11.4. ОБМЕН СЛОЖНЫХ БЕЛКОВ – НУКЛЕОПРОТЕИНОВ .....	158
Лабораторная работа 1 Обнаружение мочевой кислоты при помощи мурексидной пробы .....	160
Лабораторная работа 2 Количественное определение мочевой кислоты в моче.....	161
ТЕМА 11.5. ОБМЕН СЛОЖНЫХ БЕЛКОВ – ГЕМОПРОТЕИНОВ .....	162
Лабораторная работа 1 Определение концентрации гемоглобина в крови гемоглобинцианидным методом .....	164
Лабораторная работа 2 Определение концентрации билирубина и его фракций в сыворотке крови по диазореакции Эрлиха .....	165
Лабораторная работа 3 Определение концентрации билирубина в моче экспресс-методом.....	166
ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ по разделу «Обмен белков» .....	168
СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ ПО РАЗДЕЛУ «ОБМЕН БЕЛКОВ» .....	170
РАЗДЕЛ 12. ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ.....	172
ТЕМА 12.1. БИОХИМИЯ ГОРМОНОВ БЕЛКОВО-ПЕПТИДНОЙ ПРИРОДЫ И ПРОИЗВОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ .....	172
МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГОРМОНОВ.....	174
Лабораторная работа 1 Качественные реакции определения инсулина.	175
Лабораторная работа 2 Качественные реакции определения адреналина .....	176
Лабораторная работа 3 Качественная реакция определения тироксина	177
Лабораторная работа 4 Влияние адреналина на содержание глюкозы в крови .....	177
ТЕМА 12.2. БИОХИМИЯ ГОРМОНОВ СТЕРОИДНОЙ ПРИРОДЫ.....	178
Лабораторная работа 1 Качественные реакции определения фолликулина .....	180
ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ГОРМОНОВ.....	181
ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ПО РАЗДЕЛУ «ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ».....	184
СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ ПО РАЗДЕЛУ «ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ» .....	187
РАЗДЕЛ 13. БИОХИМИЯ КРОВИ.....	188
ТЕМА 13.1. АЗОТСОДЕРЖАЩИЕ ВЕЩЕСТВА КРОВИ: БЕЛКИ, ФЕРМЕНТЫ, ФРАКЦИИ ОСТАТОЧНОГО АЗОТА .....	188
Лабораторная работа 1 Определение активности щелочной фосфатазы .....	189
Лабораторная работа 2 Количественный метод определения остаточного азота крови по методу Асселя.....	191
Лабораторная работа 3 Рефрактометрический метод определения белка в сыворотке крови .....	193
Лабораторная работа 4 Метод электрофоретического разделения белков на бумаге (демонстрация).....	195
ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МЕТОДОВ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ БЕЛКОВ .....	197
КОМПЛЕКСНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВ ОСТРОЙ ФАЗЫ .....	200
ТЕМА 13.2. ДЫХАТЕЛЬНАЯ ФУНКЦИЯ КРОВИ.....	205
Лабораторная работа 1 Определение основных показателей кислотно-основного состояния.....	206

Лабораторная работа 2 Количественное определение неорганического фосфора в сыворотке крови .....	212
Лабораторная работа 3 Колориметрический метод определения хлоридов в крови .....	213
СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ ПО РАЗДЕЛУ «БИОХИМИЯ КРОВИ» .....	215
РАЗДЕЛ 14. БИОХИМИЯ ПОЧЕК.....	216
ТЕМА 14.1. ИССЛЕДОВАНИЕ НОРМАЛЬНОЙ И ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ МОЧИ .....	216
Лабораторная работа 1 Определение относительной плотности мочи... ..	217
Лабораторная работа 2 Определение рН мочи .....	218
Лабораторная работа 3 Колориметрический метод определения активности амилазы мочи .....	219
Лабораторная работа 4 Полуколичественное определение глюкозы.....	220
Лабораторная работа 5 Определение содержания кетоновых тел, восстанавливающих веществ, глюкозы, белка, рН с помощью тест-полосок "Пентафан" .....	221
Лабораторная работа 6 Экспресс-метод определения глюкозы .....	222
Лабораторная работа 7 Определение концентрации кетоновых тел.....	224
Лабораторная работа 8 Определение гемоглобина и эритроцитов с помощью тест-полосок "Гемофан" .....	226
СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ ПО РАЗДЕЛУ «БИОХИМИЯ ПОЧЕК» .....	227
РАЗДЕЛ 15. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ .....	228
ТЕМА 15.1. БИОТРАНСФОРМАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ .....	228
Лабораторная работа 1 Определение ПАСК в моче экспресс-методом с применением бумаги «Биофанпас» .....	229
Лабораторная работа 2 Методы исследования биотрансформации ксенобиотиков .....	230
ЭТАЛОНЫ ОТВЕТОВ К ТЕСТОВЫМ ВОПРОСАМ И СИТУАЦИОННЫМ ЗАДАЧАМ .....	236
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	253

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АлАТ – аланинаминотрансфераза  
АсАТ – аспартатаминотрансфераза  
ГАМК -  $\gamma$ -аминомасляная кислота  
ГТТ – глюкозотолерантный тест  
2,4-ДНФГ – 2,4-динитрофенилгидразин  
ИА – индекс атерогенности  
ИФА – иммуноферментный анализ  
КК – креатинкиназа  
ЛДГ – лактатдегидрогеназа  
ЛПВП – липопротеины высокой плотности  
ЛПНП – липопротеины низкой плотности  
ЛПОНП – липопротеины очень низкой плотности  
МДА – малоновый диальдегид  
НАД – окисленный никотинамиддинуклеотид  
Hb – гемоглобин  
ОФД – ортофенилендиамин  
ПАСК – парааминосалициловая кислота  
ПОЛ – перекисное окисление липидов  
ПФ – пиридоксальфосфат  
ПЦР – полимеразная цепная реакция  
СФ – спектрофотометр  
ТАГ – триацилглицеролы  
ТБК – тиобарбитуровая кислота  
ТМБ – тетраметилбензидин  
ТПФ – тиаминпирофосфат  
ТТГ – тест толерантности к глюкозе  
ФАД – окисленный флавинадениндинуклеотид  
ФМН – окисленный флавиномононуклеотид  
ФЭК – фотоэлектроколориметр  
ХС – холестерол



## ВВЕДЕНИЕ

Биохимия в последние годы развивается стремительно, что связано с совершенствованием методов и применением новых эффективных приемов. В связи с этим возникает необходимость в создании новых учебных пособий, которые отражают практическое значение биохимии для будущей профессиональной деятельности провизоров.

Данное учебное пособие содержит информацию по каждой теме, указывает актуальность и практическое значение изучаемого материала; знакомит студентов с такими прикладными аспектами молекулярной биологии, как биохимия иммунитета; биологических мембран, а также формами их моделирования, например, липосомами, и другими лекарственными препаратами в соответствии с разделами.

Наиболее актуальным в настоящее время для студентов фармацевтического факультета является рассмотрение нового раздела – «фармацевтической биохимии». Данный раздел дает представление об основных закономерностях метаболизма биогенных и биотрансформации синтетических лекарственных веществ; знакомит студентов с методами выявления продуктов конъюгации. Раздел энзимологии изложен с указанием основных направлений применения ферментов в медицине и фармации. Приведены примеры методов ферментативного анализа биологических субстратов, указаны преимущества иммобилизованных ферментов.

Настоящее учебное пособие не только знакомит студентов с методами количественного и качественного анализа веществ, но и позволяет им проверить свои знания по вопросам для самоподготовки. Многие разделы учебного пособия включают новую информацию, дополняющую материал изложенный в учебниках по биологической химии.

# РАЗДЕЛ 1. СТРОЕНИЕ, СВОЙСТВА И ФУНКЦИИ БЕЛКОВ

## ТЕМА 1.1. СТРОЕНИЕ И КЛАССИФИКАЦИЯ АМИНОКИСЛОТ

### *Актуальность*

Белки – важнейший пластический материал клеток живого организма, по структуре являются сложными полимерными соединениями, состоящими из простых, низкомолекулярных веществ-мономеров, роль которых выполняют аминокислоты. Именно особенностями аминокислотного состава обусловлено огромное разнообразие состава, структуры. Знание структурной организации и свойств белковых молекул необходимо для понимания основных специфических функций (каталитической, регуляторной, рецепторной, транспортной и т.д.), благодаря которым белкам принадлежит решающая роль во всех процессах жизнедеятельности.

### *Цель*

Приобретение практических навыков по проведению качественного анализа биологических жидкостей и растворов на присутствие аминокислот и белков, основанных на знании принципов цветных реакций (биуретовой, ксантопротеиновой, нингидриновой, реакции Фоля).

### *Студент должен знать*

1. Понятия «аминокислота», «пептид», «белок».
2. Элементарный состав и функции белков в организме.
3. Основные физико-химические свойства аминокислот. Роль функциональных групп.
4. Классификации аминокислот по биологической роли и строению радикала (формулы 20 важнейших аминокислот)
5. Образование пептидной связи, лежащей в основе построения пептидов и первичной структуры белковой молекулы. Уметь построить и назвать пептид.

### *Вопросы для самоподготовки*

1. Какие органические молекулы называются белками? Охарактеризовать элементарный состав белков.
2. Какова роль белков в организме?
3. Какие принципы лежат в основе разделения аминокислот? Привести примеры классификаций.

4. Какие аминокислоты участвуют в построении белка организма человека?
5. Встречаются ли аминокислоты в организме в свободном виде?
6. Перечислить основные физико-химические свойства аминокислот. Какова роль функциональных групп аминокислот?
7. Что называют радикалом аминокислот? Привести примеры. Назвать их роль.
8. Какие аминокислоты называют незаменимыми? Перечислить, привести примеры химического строения.
9. Какие аминокислоты характеризуются наибольшей гидрофобностью? Привести примеры их химического строения.
10. Какие аминокислоты являются наиболее гидрофильными? Привести примеры их химического строения.
11. Назвать аминокислоты, имеющие при рН 7,0 дополнительный отрицательный заряд, написать их формулы в ионизированном состоянии.
12. Назвать аминокислоты, имеющие при рН 7,0 дополнительный положительный заряд, написать их формулы в ионизированной форме.
13. Как влияет изменение рН среды на ионизацию аминокислот.
14. Написать формулы серосодержащих аминокислот.
15. Написать формулы циклических аминокислот.
16. Написать формулы иминокислот.
17. Написать примеры химического строения аминокислот, обладающих нейтральными, кислыми и основными свойствами.
18. Какая связь называется пептидной? Написать реакцию образования пептидной связи.
19. Построить трипептид и дать ему название. Указать его растворимость и заряд при рН 7,0. В какой области рН лежит его изоэлектрическая точка?
20. Назвать примеры аминокислот, используемых в качестве лекарственных препаратов.

### Лабораторная работа 1

#### Цветные реакции на белки и аминокислоты

##### *Реактивы*

- 1) 1% раствор яичного белка, 2) 0,5% раствор нингидрина, 3) 30% NaOH, 4) 10% NaOH, 5) 0,5% раствор нингидрина, 6) конц.  $H_2SO_4$ , 7) 1% раствор  $CuSO_4$ , 8) 5% раствор  $Pb(CH_3COO)_2$ , 9) конц.  $HNO_3$ .

### *Материал исследования*

При изучении цветных реакций в учебной лаборатории в качестве объекта исследования используют 1% водный раствор яичного белка, содержащего полный набор аминокислот. В пронумерованные пробирки наливают по 5 капель раствора белка.

Руководствуясь указаниями, проделывают цветные реакции, наблюдают результаты и записывают выводы.

#### *БИУРЕТОВАЯ РЕАКЦИЯ*

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

##### *Принцип*

Пептидная группа образует в щелочной среде с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  комплексное соединение фиолетового цвета с красным или синим оттенком в зависимости от числа пептидных связей. Интенсивность окрашивания пропорциональна количеству пептидных групп.

##### *Проведение анализа*

В пробирку с раствором белка вносят 3 капли 10% NaOH и 1 каплю 1% раствора  $\text{CuSO}_4$ .

#### *НИНГИДРИНОВАЯ РЕАКЦИЯ*

Универсальная реакция для обнаружения любых  $\alpha$ -аминогрупп, содержащихся в аминокислотах, пептидах, белках.

##### *Принцип*

$\alpha$ -аминогруппа аминокислот, взаимодействуя с нингидрином, образует комплекс синего или сине-фиолетового цвета. При нагревании аминокислот с нингидрином происходит окислительное дезаминирование  $\alpha$ -аминогрупп и восстановление нингидрина. Восстановленный нингидрин реагирует с аммиаком и другой молекулой окисленного нингидрина с образованием окрашенного продукта. Пролин и окипролин дают продукт желтого цвета.

##### *Проведение анализа*

Раствор белка смешивают с 5 каплями 0,5% раствора нингидрина. Пробирки нагревают и кипятят 1 минуту. Отмечают появление сине-фиолетового окрашивания.

#### *КСАНТОПРОТЕИНОВАЯ РЕАКЦИЯ*

Реакция на ароматические аминокислоты (фенилаланин, тирозин, триптофан).

*Принцип*

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

*Проведение анализа*

К раствору белка добавляют 2 капли концентрированной азотной кислоты и осторожно нагревают. Наблюдают за появлением желтого окрашивания, переходящего при добавлении 30% NaOH в оранжевое окрашивание.

*РЕАКЦИЯ ФОЛЯ**Принцип*

Серосодержащие аминокислоты при взаимодействии с плюмбитом свинца  $Pb(CH_3COO)_2$  дают черный или бурый осадок сульфида свинца.

*Проведение анализа*

К 5 каплям гидролизата добавляют 1 каплю раствора уксуснокислого свинца и нагревают до кипения. Отмечают появление бурого или черного осадка.

*Практическое значение цветных реакций*

Цветные реакции, являясь качественными универсальными (биуретовая, нингидриновая и др.) и специфическими (реакция Фоля, и др.) методами определения, позволяют обнаружить белок и его структурные компоненты аминокислоты, не только для изучения состава и установления белковой природы вещества, но также могут использоваться и в основе методов их количественного определения.

*Оформление работы*

Результаты оформляют в виде таблицы. Интенсивность окраски помечают следующим образом: – отсутствие окраски; + слабая окраска; ++ сильная окраска; +++ очень сильная окраска. В выводах указывается, какое вещество содержится в каждой пробе.

№ пробы	Реакции				Что содержится
	Нингидриновая	Ксантопротеиновая	Фоля	Биуретовая	

## Лабораторная работа 2

### Исследование наличия белка и свободных аминокислот в биологическом материале

Химический состав биологических жидкостей (кровь, моча, желудочный сок, слюна и т.п.) характеризуется постоянством и отражает состояние биохимических процессов, происходящих в тканях, органах. Отклонение от нормы в качественном и количественном составе биологических жидкостей может быть показателями патологического процесса (т.е. болезни). Свойство биологических жидкостей изменять свой состав при патологии нашло применение в медицинской практике для диагностики заболеваний и контроля лечения.

При выполнении работы необходимо ответить на следующие вопросы: Имеются ли у здорового человека свободные аминокислоты в моче? В сыворотке?

#### *Материал исследования*

Сыворотка крови, слюна, моча.

#### *Реактивы*

1) 0,5% раствор нингидрина, 2) 1% NaOH, 3) 3% уксусная кислота, 4) 1%. CuSO<sub>4</sub>.

#### *Проведение анализа*

С 5 каплями сыворотки, слюны, мочи проводят биуретовую реакцию, определяя наличие или отсутствие белка в пробах. В другой порции исследуемых жидкостей (там, где это необходимо) белок осаждают нагреванием в присутствии уксусной кислоты (10 капель исследуемого материала и 2 капли кислоты). Отделяют белок фильтрованием, предварительно смочив фильтр водой. В безбелковом фильтрате с помощью нингидриновой реакции определяют наличие  $\alpha$ -аминокислот – если жидкость не содержит белок, нингидриновую реакцию проводят с 10 каплями исследуемого материала.

### *Оформление работы*

Результаты анализа вносят в таблицу. Знаками «+» и «-» отметить результаты наблюдения.

Материалы исследования	Объекты исследования	
	Белок	Свободные аминокислоты
Сыворотка Слюна Моча		

### *Практическое значение*

Цветные реакции на белок используют в клинико-биохимических лабораториях и биохимических исследованиях для обнаружения присутствия белка и аминокислот в биологических средах, качественного анализа белковых лекарственных средств в фармацевтической практике.

## **ТЕМА 1.2. КЛАССИФИКАЦИЯ И ФУНКЦИИ БЕЛКОВ В ОРГАНИЗМЕ**

### *Актуальность*

Белки играют решающую роль в жизнедеятельности отдельных клеток и всего многоклеточного организма, так как выполняют разнообразные специфические функции: транспорт кислорода и других соединений, хранение и передачу наследственной информации и т.д. Многообразие функций белков определяется особенностями их первичной структуры и конформации, уникальностью строения активного центра и способностью связывать специфические лиганды. Особенности строения этих макромолекул и их изменения лежат в основе развития ряда патологических процессов. Изучение их структуры необходимо для понимания роли в организме и характера нарушений при некоторых заболеваниях (серповидноклеточная анемия, наследственные нарушения биосинтеза белков и др.) Реакция открытия белковой и простетической групп позволяют понять состав и строение сложных белков, а также использовать эти данные для количественного определения.

### *Цель*

Изучение структуры сложных белков (фосфопротеинов, нуклеопротеинов, гликопротеинов), путем выделения их структурных компонентов из разных объектов качественными реакциями.

*Вопросы для самоподготовки*

1. Классификации белков по биологическим функциям.
2. Классификация белков по химической структуре.
3. Характеристика и особенности строения простых белков: протамины, гистоны и др.
4. Нуклеопротеины, их функции и структурные элементы. Структура и свойства нуклеиновых кислот. Отличия ДНК и РНК.
5. Фосфопротеины. Их строение и биологические функции.
6. Хромопротеины, химическая структура и основные функции. Гемопротеины, строение гема.
7. Гликопротеины, структура, функции в организме. Представление о строении простетической группы – гиалуроновая кислота и другие гликозаминогликаны.
8. Липопротеины. Представления о строении, основные транспортные формы липидов плазмы – хиломикроны, липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП), липопротеины низкой плотности (ЛПНП), липопротеины высокой плотности (ЛПВП).

## Лабораторная работа 1

**Выделение и анализ химического состава сложных белков**

Качественные реакции на небелковые компоненты используют для обнаружения сложных белков в различных объектах.

*А. ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕОПРОТЕИНОВ В ГИДРОЛИЗАТЕ ДРОЖЖЕЙ*

В гидролизате дрожжей качественными реакциями определяют белковую часть, пуриновые или пиримидиновые основания, углеводы рибозу и дезоксирибозу, фосфорную кислоту.

*Материал исследования*

Гидролизат пекарских дрожжей (готовят лаборанты): 1 г дрожжей кипятят в течении 1 часа в колбе с обратным холодильником в присутствии 20 мл 1%  $H_2SO_4$  и 20 мл дистиллированной воды. Фильтруют.

*Реактивы*

1) 1% раствор тимола в этиловом спирте, 2) 10% раствор NaOH, 3) конц. раствор аммиака, 4) молибденовый реактив, 5) конц.  $H_2SO_4$ , 6) 1% раствор  $CuSO_4$ , 7) 1% аммиачный раствор серебра нитрата, 8) 10% уксусная кислота, 9) конц. уксусная кислота.



### *Биуретовая реакция на полипептиды*

#### *Принцип*

Пептидная группа образует в щелочной среде с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  комплексное соединение фиолетового цвета с красным или синим оттенком в зависимости от числа пептидных связей. Интенсивность окрашивания пропорциональна количеству пептидных групп.

#### *Проведение анализа*

К 5 каплям гидролизата добавляют 10 капель 10% NaOH и 1 каплю 1%  $\text{CuSO}_4$ . Развивается розово-фиолетовое окрашивание.

### *Серебряная проба на пуриновые основания*

#### *Принцип*

Пуриновые основания (аденин и гуанин) при взаимодействии с нитратом серебра образуют бурый осадок серебряных солей.

#### *Проведение анализа*

10 капель гидролизата нейтрализуют 10 каплями концентрированного аммиака, добавляют 10 капель аммиачного раствора серебра. Через 5-10 мин образуется светлокоричневый рыхлый осадок.

### *Реакция Молиша на углеводные группы ( $\beta$ -D-рибоза)*

#### *Принцип*

При конденсации тимола с гидроксиметилфурфуролом, продуктом дегидратации пентоз серной кислотой, развивается красное окрашивание.

#### *Проведение анализа*

К 10 каплям гидролизата добавляют 2 капли раствора тимола, перемешивают и осторожно по стенке добавляют концентрированную  $\text{H}_2\text{SO}_4$  до появления розового кольца в пробирке.

### *Молибденовая проба на фосфорную кислоту*

#### *Принцип*

При реакции фосфорной кислоты с раствором молибденовокислого аммония в азотной кислоте образуется окрашенное комплексное соединение аммония фосфомолибдата.

#### *Проведение анализа*

К 10 каплям гидролизата добавляют 20 капель молибденового реактива, кипятят. Жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет. Пробирку охлаждают в струе воды, на дне появляется лимонно-желтый осадок аммония фосфомолибдата.

### *Б. ВЫДЕЛЕНИЕ ФОСФОПРОТЕИНОВ В МОЛОКЕ*

*Материал исследования:* молоко

*Принцип*

При подкислении молоко свертывается, благодаря выпадению в осадок белка казеиногена ( $pI=4,7$ ).

*Проведение анализа*

К 2,0 мл молока приливают равный объем дистиллированной воды, перемешивают. Добавляют 2 капли уксусной кислоты. Хлопьевидный осадок отфильтровывают.

Половину осадка снимают палочкой с фильтра в пробирку. Для выявления фосфора добавляют 20 капель молибденового реактива, кипятят. Наблюдают выпадение желтого осадка.

На фильтре проделывают биуретовую реакцию на белковую часть.

### *В. ВЫДЕЛЕНИЕ ГЛИКОПРОТЕИНОВ В СЛЮНЕ*

*Материал исследования*

Слюна, собранная после ополаскивания рта водой.

*Проведение анализа*

В двух пробирках собирают по 1 мл слюны, по каплям приливают концентрированную уксусную кислоту до появления сгустка муцина.

В одной пробирке проводят биуретовую реакцию, предварительно добавив 10 капель 10% NaOH для нейтрализации кислоты.

Во второй пробирке проводят реакцию Молиша на углеводный компонент муцина. Для этого жидкость сливают и к сгустку добавляют 2-3 капли раствора тимола. Перемешивают. По стенке осторожно добавляют концентрированную  $H_2SO_4$  до появления розового окрашивания.

*Оформление работы*

Результаты работы заносятся в таблицу: Делается вывод о составе сложных белков.

Сложные белки	Объект исследования	Компонент	Реакции открытия	
			Используемые реактивы	Окрашивание

Нуклео- протеины	Дрожжи	Белок		
		Пуриновые основания		
		Пентозы		
		Фосфорная кислота		
Глико- протеины	Слюна	Белок		
		Углеводы		
Фосфо- протеины	Молоко	Белок		
		Фосфорная кислота		

### ТЕМА 1.3. СТРОЕНИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ

#### *Актуальность*

Индивидуальные белки различаются по физико-химическим свойствам (форме молекул, молекулярной массе, суммарному заряду, степени устойчивости к воздействию различных денатурирующих агентов и др.). Величина заряда белков – один из факторов, увеличивающих их растворимость. При потере заряда в изоэлектрической точке белки легче агрегируют и выпадают в осадок. Это особенно характерно для денатурированных белков, у которых на поверхности появляются гидрофобные радикалы аминокислот.

Важное место в биохимических исследованиях занимает выделение индивидуальных белков из органов и тканей. Некоторые очищенные индивидуальные белки используют в медицине как лекарственные препараты, например гормон инсулин применяют для лечения сахарного диабета, а пищеварительные ферменты поджелудочной железы назначают при нарушении ее функций в качестве заместительной терапии.

Выделение белков из растворов при различных способах осаждения используют в медицине для диагностических целей. Кроме того, очищенные ферменты часто применяют в биохимических исследованиях в качестве химических реактивов для определения веществ в биологических жидкостях.

#### *Цель*

Ознакомление с методами и приобретение навыков выделения, фракционирования белков в биологическом материале.

### *Вопросы для самоподготовки*

1. Назовите способы определения молекулярной массы белковой молекулы.
2. Охарактеризуйте структурную организацию белковой молекулы.
3. Какие связи формируют конформации белков на различных уровнях структурной организации.
4. Назовите примеры глобулярных и фибриллярных белков.
5. Четвертичная структура белков. Понятие олигомер, протомер.
6. Кооперативные изменения конформации протомеров на примере молекулы гемоглобина.
7. Ионизация молекул белка (заряд), гидратация и растворимость. Свойства белковых растворов.
8. Понятия изоэлектрическая точка и изоэлектрическое состояние. Свойства белковых молекул в изоэлектрической точке.
9. Методы осаждения белков из растворов, их практическое применение в медицине.
10. Назовите особенности механизма денатурации белков. Свойства денатурированного белка.
11. Факторы, вызывающие денатурацию белков (физические, химические, биологические). Ренативация.

### Лабораторная работа 1

#### **Высаливание белков**

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

#### *Реактивы*

1) насыщенный раствор  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2) кристаллический  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 3) 10% NaOH, 4) 1%  $\text{CuSO}_4$ .

#### *Материал исследования*

Сыворотка крови, яичный белок.

#### *Принцип*

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

### *Проведение анализа*

К 20 каплям яичного белка добавляют равный объем сульфата аммония (получается полунасыщенный раствор), в котором выпадает осадок яичного глобулина. Через 5 мин осадок отделяют фильтрованием. Наличие белка на фильтре доказывают биуретовой реакцией. К фильтрату добавляют порошок сульфата аммония до полного насыщения, при этом выпадает осадок альбуминов. Обратимость осаждения проверяют, добавляя к осадку дистиллированную воду.

Аналогично проводится фракционирование белков сыворотки крови.

### *Практическое значение*

Метод высаливания используют в клинических лабораториях для разделения альбуминов и глобулинов, определения их соотношения в сыворотке крови. В норме отношение альбумин/глобулин в сыворотке крови человека колеблется в пределах 1,5-2,3 и меняется при патологии, например, при воспалительных заболеваниях увеличивается содержание глобулинов.

### *Оформление работы*

Отмечают принцип метода, регистрируют результаты анализа и делают вывод о возможности выделения белка данным методом.

## Лабораторная работа 2

### **Исследование денатурации белков**

Денатурация белков – это изменение структурной организации белковой молекулы (четвертичной, третичной и даже вторичной структуры), приводящее к изменению физико-химических и биологических свойств белка.

Денатурирующие факторы делятся на химические (кислоты, тяжелые металлы), физические (ультразвук, высокая и низкая температура), биологические (протеолитические ферменты – трипсин, пепсин и др.).

### *Реактивы*

1) 1% и 10%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 2) ацетон, 3) 10% ТХУ, 4) конц. $\text{HNO}_3$ , 5) 1%  $\text{CuSO}_4$ , 6) конц. $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 7) 5%  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ , 8) танин, 9) сульфосалициловая кислота, 10) 10%  $\text{NaOH}$ , 11) насыщенный раствор  $\text{NaCl}$ .

### *Материал исследования*

Сыворотка крови, яичный белок.

*Принцип*

Денатурация снижает гидрофильность белков и устойчивость их в растворе.

*ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОЙ ДЕНАТУРАЦИИ**Проведение анализа*

В ряд пронумерованных пробирок вносят по 5 капель 1% раствора яичного белка и добавляют реактивы, пользуясь указаниями таблицы (см ниже). Необратимость осаждения белка устанавливают добавлением к осадку 10-20 капель дистиллированной воды.

Денатурирующие агенты	№ проб	Используемые реактивы	Число капель	Механизм и особенности реакции	Осадок
Соли тяжелых металлов	1 2	Меди сульфат Свинца ацетат	2 2	Ионы металлов связываются с функциональными группами аминокислот, в результате чего разрушается пространственная структура белка	
Концентрированные минеральные кислоты					
а) небольшие количества	3 4	Азотная Серная	2 2	Кислоты вызывают дегидратацию частиц, нейтрализацию комплексных соединений с белками. Обратите внимание на поведение белка в избытке кислот	
б) избыток	5 6	Азотная Серная	10 10		
Органические кислоты					
	7	Трихлоруксусная	2	Осаждает только белки	
	8	Сульфосалициловая	2	Кроме белков осаждает полипептиды. Кислоты нейтрализуют заряд, образуют комплексы с белком.	
Алкалоиды	9	Танин	2	Образуются нерастворимые солеобразные соединения с основными азотистыми группами белка	
Органические	10	Ацетон	5	Нарушаются гидрофобные взаимодействия внутри	

раствори- тели				белковой молекулы.	
-------------------	--	--	--	--------------------	--

### *Оформление работы*

Отмечают принцип метода, регистрируют результаты анализа в таблице и делают вывод. Указывают интенсивность денатурации по образованию осадка.

## **ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ДЕНАТУРИРУЮЩИХ АГЕНТОВ В МЕДИЦИНЕ**

Реакции химической денатурации в биохимических исследованиях, используют для осаждения белка в биологическом материале, с целью дальнейшего определения в фильтрате низкомолекулярных веществ; для выявления присутствия белка в различных физиологических жидкостях и количественного анализа.

В медицине денатурирующие агенты часто используют для стерилизации медицинских инструментов и материала, а также в качестве антисептиков. Например, в автоклавах при высокой температуре стерилизуют медицинские инструменты и материалы.

Фенол и его производные (крезол, резорцин) относят к известным антисептикам ароматического ряда. Обладая высокой гидрофобностью, они эффективно действуют на вегетативные формы бактерий и грибы, вызывая денатурацию их белков.

Значительное количество антисептиков представлено солями тяжелых металлов. Их антимикробное действие связано с тем, что взаимодействуя с белками микроорганизмов, они блокируют их SH-группы, изменяя конформацию. Из-за высокой токсичности большинство лекарств, содержащих соли тяжелых металлов, применяют в качестве поверхностных антисептиков.

### **ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ПО РАЗДЕЛУ "СТРОЕНИЕ, СВОЙСТВА И ФУНКЦИИ БЕЛКОВ"**

1. ДИСУЛЬФИДНУЮ СВЯЗЬ СОДЕРЖИТ:

- 1) метионин
- 2) цистин
- 3) аспарагиновая кислота

2. В ПРОЦЕССЕ ГИДРОЛИЗА БЕЛКА ПРОИСХОДИТ

- 1) уменьшение количества свободных –COOH групп
- 2) увеличение содержания –NH<sub>2</sub> групп

3. ОСНОВНЫМИ СВОЙСТВАМИ ОБЛАДАЮТ АМИНОКИСЛОТЫ:
  - 1) лейцин
  - 2) треонин
  - 3) гистидин
  - 4) лизин
  - 5) аргинин
4. ПРОИЗВОДНЫМИ АРОМАТИЧЕСКИХ КИСЛОТ ЯВЛЯЮТСЯ АМИНОКИСЛОТЫ:
  - 1) фенилаланин
  - 2) аланин
  - 3) триптофан
  - 4) тирозин
  - 5) метионин
5. ГИДРОКСИЛЬНАЯ ГРУППА ВХОДИТ В СОСТАВ АМИНОКИСЛОТ:
  - 1) аланин
  - 2) тирозин
  - 3) треонин
  - 4) метионин
  - 5) серин
6. К СЕРУСОДЕРЖАЩИМ ПО СТРУКТУРЕ ОТНОСЯТСЯ АМИНОКИСЛОТЫ:
  - 1) глицин
  - 2) метионин
  - 3) аланин
  - 4) цистеин
  - 5) лейцин
  - 6) цистин
7. ОТРИЦАТЕЛЬНО ЗАРЯЖЕННЫЕ ГРУППЫ В СТРУКТУРЕ РАДИКАЛА СОДЕРЖАТ АМИНОКИСЛОТЫ:
  - 1) глицин
  - 2) аспарагиновая
  - 3) глутамин
  - 4) глутаминовая кислота
  - 5) гистидин
8. ПОЛОЖИТЕЛЬНО ЗАРЯЖЕННЫЕ ГРУППЫ В СТРУКТУРЕ РАДИКАЛА СОДЕРЖАТ АМИНОКИСЛОТЫ:
  - 1) валин
  - 2) лизин
  - 3) метионин



- 4) аргинин
  - 5) глицин
  - 6) гистидин
9. В ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ТОЧКЕ БЕЛОК ИМЕЕТ ЗАРЯД:
- 1) положительный
  - 2) отрицательный
  - 3) нейтральный
10. БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФУНКЦИЕЙ ГЕМОГЛОБИНА ЯВЛЯЕТСЯ:
- 1) построение соединительной ткани
  - 2) транспорт кислорода
  - 3) сократительная деятельность мышц
11. КЕРАТИН ПРЕДСТАВЛЯЕТ СОБОЙ:
- 1) хорошо растворимый в воде белок
  - 2) фибриллярный белок волос
  - 3) белок, переносящий кислород
12. ПО ФОРМЕ МОЛЕКУЛЫ ГЛОБУЛЯРНЫМИ ЯВЛЯЮТСЯ БЕЛКИ:
- 1) эластин
  - 2) коллаген
  - 3) альбумин
  - 4) гемоглобин
  - 5) глобулин
13. ПРОИЗВОДНЫМИ АМИНОКИСЛОТЫ ТИРОЗИНА ПО СТРОЕНИЮ ЯВЛЯЮТСЯ ГОРМОНЫ:
- 1) адреналин в мозговом слое надпочечников
  - 2) тироксин в щитовидной железе
  - 3) инсулин в поджелудочной железе
14. ГЛУТАМИНОВАЯ КИСЛОТА ПРЕОБЛАДАЕТ В АМИНОКИСЛОТНОМ СОСТАВЕ БЕЛКА:
- 1) альбумина
  - 2) гистона
  - 3) глобулина
15. АМИНОКИСЛОТЫ ЛИЗИН И АРГИНИН ПРЕОБЛАДАЮТ В АМИНОКИСЛОТНОМ СОСТАВЕ БЕЛКА:
- 1) глобулина
  - 2) гистона
  - 3) альбумина
16. ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ВОДОЙ БЕЛКИ ОБРАЗУЮТ:
- 1) истинные растворы
  - 2) коллоидные растворы

17. ПРОСТЕТИЧЕСКУЮ ГРУППУ (ГЕМ) ГЕМОГЛОБИНА С ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПЬЮ (ГЛОБИНОВОГО КОМПОНЕНТА) СВЯЗЫВАЮТ ОСТАТКИ АМИНОКИСЛОТ:

- 1) аланин
- 2) глицин
- 3) гистидин
- 4) тирозин

18. В СОСТАВЕ ФОСФОПРОТЕИНА ФОСФОРНУЮ КИСЛОТУ С АПОПРОТЕИНОМ (БЕЛКОВЫМ КОМПОНЕНТОМ) СВЯЗЫВАЮТ ОСТАТКИ АМИНОКИСЛОТ:

- 1) лизин
- 2) метионин
- 3) серин
- 4) аланин?

## РАЗДЕЛ 2. СТРОЕНИЕ, КЛАССИФИКАЦИЯ И РОЛЬ ВИТАМИНОВ

### *Актуальность*

Витаминами называют низкомолекулярные органические вещества различной химической природы, необходимые для обеспечения нормального протекания биохимических и физиологических процессов в организме. При этом витамины не включаются в структуру тканей и не используются в организме в качестве источника энергии. В организме не синтезируются и являются незаменимыми пищевыми факторами. Биологическая роль витаминов связана с регуляцией обменных процессов в организме, поскольку многие из них входят в состав коферментов (простетических групп) ферментов. При недостаточном поступлении витаминов в организм развиваются тяжелые заболевания – авитаминозы (при полном отсутствии поступления витаминов) и гиповитаминозы (при малом, недостаточном для нормального течения жизнедеятельности поступлении витаминов). Может встречаться одновременная недостаточность нескольких витаминов – полиавитаминозы и полигиповитаминозы. В основе этих патологических нарушений во многих случаях лежат нарушения в ферментативных системах, приводящих к расстройству обмена веществ. Эти особенности влияния витаминов на организм послужили основанием для их комбинированного применения, как в профилактических, так и в лечебных целях в виде так называемых поливитаминных препаратов. К числу поливитаминных препаратов относятся: тетравит, пентовит, декавит, аснитин и др.

### *Цель*

Освоение качественных методов открытия витаминов в стандартных растворах и продуктах питания; а также приобретение навыков количественного определения витамина С в растительных объектах и биологическом материале.

### *Студент должен знать*

1. Классификацию и номенклатуру витаминов.
2. Химическую структуру жирорастворимых витаминов А, D<sub>3</sub>.
3. Иметь представление о химической структуре витаминов К, Е, F.
4. Химическую структуру водорастворимых витаминов (В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>6</sub>, РР, С, Н) и их биологически активных (коферментных) форм (ТДФ, ФМН и ФАД, НАД и НАДФ, ПФ).

5. Иметь представление о химической структуре витаминов В<sub>12</sub>, В<sub>С</sub>, (фолиевая кислота), В<sub>3</sub> (пантотеновая кислота).
6. Характеристику отдельных жиро- и водорастворимых витаминов, отмечая особо их биологическую роль и клиническую картину авитаминозов, суточную потребность.

*Вопросы для самоподготовки*

1. Какие вещества относят к витаминам?
2. Каким образом витамины регулируют обменные процессы?
3. Классификация и номенклатура витаминов.
4. Какие вещества относят к провитаминам? Привести примеры превращения провитаминов в витамины.
5. Какие вещества относят к антивитаминам? Примеры использования антивитаминов в качестве лекарственных средств.
6. Гипо-, и авитаминозы (экзогенные, эндогенные). Гипервитаминозы.
7. Применение витаминов и их антагонистов в клинической практике.

## ТЕМА 2.1. ЖИРОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ

*Задание для самоподготовки*

Составьте таблицу с указанием строения, биологической роли и других характеристик жирорастворимых витаминов. Назовите лекарственные препараты их содержащие.

Название витамина (буквенное, химическое, физиологическое)	Химическая формула	Суточная доза	Биологическая роль	Признаки гипер-, гипо- и авитаминоза	Пищевые источники	Лекарственные формы

## Лабораторная работа 1

### Качественные реакции на жирорастворимые витамины

#### *А. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА РЕТИНОЛ*

##### *Принцип*

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

##### *Реактивы*

1) Серная кислота (конц.), 2) хлороформ.

##### *Материал исследования*

Витамин А (0,05% масляной раствор).

##### *Проведение анализа*

В пробирку вносят 2 капли раствора витамина А, 5 капель хлороформа и 1-2 капли концентрированной серной кислоты. Появляется синее окрашивание, переходящее в фиолетовое, затем в красно-бурое.

#### *Б. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА КАЛЬЦИФЕРОЛ*

##### *Принцип*

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

##### *Реактивы*

1) Серная кислота (конц.), 2) хлороформ. 3) уксусный ангидрид.

##### *Материал исследования*

Витамин D (масляный раствор).

##### *Проведение анализа*

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

#### *В. ОБНАРУЖЕНИЕ ТОКОФЕРОЛА (ВИТАМИН Е)*

##### *Принцип*

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

*Реактивы*

1) Азотная кислота (конц)

*Материал исследования*

Витамин Е (0,1% спиртовой раствор).

*Проведение анализа*

В сухую пробирку вносят 2 капли раствора витамина Е и добавляют 10 капель концентрированной азотной кислоты. Пробирку встряхивают и наблюдают появление красного окрашивания. Для ускорения реакции пробирку можно поместить на 3 мин в кипящую водяную баню.

**Г. РЕАКЦИЯ НА ВИКАСОЛ (СИНТЕТИЧЕСКИЙ АНАЛОГ  
ВИТАМИНА К<sub>1</sub>)**

*Принцип*

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

*Реактивы*

1) 0,025% раствор цистеина. 2) 10% раствор натрия гидроксида.

*Материал исследования*

Викасол (0,05% раствор).

*Проведение анализа*

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

*Практическое значение*

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

*Оформление работы*

Отмечают принцип методов, регистрируют результаты анализа в таблице и делают вывод о наличии витаминов с исследуемым материалом.

<b>Название исследуемого витамина</b>	<b>Химическая формула</b>	<b>Реакция обнаружения</b>	<b>Наблюдаемое окрашивание</b>

Лабораторная работа 2  
**Обнаружение жирорастворимых витаминов  
 в пищевых источниках**

*Цель*

Сравнительная оценка пищевых источников по содержанию в них жирорастворимых витаминов.

В работе используются те же методы, которые применялись в работе «Качественные реакции на жирорастворимые витамины».

*Оформление работы*

Результаты работы представляются в виде таблицы. Делается вывод о лучших источниках жирорастворимых витаминов.

<b>Исследуемые витамины</b>	<b>Материал исследования</b>	<b>Реакция обнаружения</b>	<b>Окраска и вывод о наличии витамина</b>
Витамин А (ретинол)	1. Рыбий жир 2. Растительное масло 3. Молоко 4. Плоды шиповника 5. Плоды облепихи		
Витамин D (кальциферол) и его провитамины	1. Рыбий жир 2. Растительное масло 3. Молоко 4. Сухие дрожжи		
Витамин Е (токоферол)	1. Рыбий жир 2. Растительное масло 3. Молоко		

**ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ЖИРОРАСТВОРИМЫХ  
 ВИТАМИНОВ**

*Использование витамина А:* В качестве лекарственных препаратов используют как природные витамины группы А (рыбий жир), так и полученные методом химического синтеза (аксероферол ацетат и пальмитат). В лечебных целях витамин А используют при инфекционных заболеваниях, ослаблении зрения, нарушениях функций желудочно-кишечного тракта. Витамин А показан в комплексной терапии сердечно-сосудистых заболеваний, а также

при воздействии на организм токсических химических веществ. Препарат вводится per os в капсулах.

*Применение витамина Д:* Лекарственная форма витамина Д<sub>3</sub> представляет собой масляный раствор, применяемый per os или парэнтерально для профилактики рахита, при спазмофилии, гипокальциемии, остеомалации и остеопорозе. В дозах, превышающих 15-20 мкг в день, витамин Д<sub>3</sub> оказывает токсическое действие на почки и сердечно-сосудистую систему.

*Применение витамина Е:* В медицинской практике используют как природные так и синтетические препараты альфа-токоферола ацетата в растительном масле, заключенные в капсулы. Препараты витамина Е используются в качестве антиоксидантов при облучении и других патологических состояниях, связанных с повышенным содержанием в организме активных форм кислорода. Витамин Е назначают беременным женщинам в комплексной терапии лечения бесплодия. Показан этот витамин при мышечной дистрофии и некоторых заболеваниях печени.

*Использование витамина К:* Лекарственные формы витамина К – таблетки и капсулы, используют в качестве заместительной терапии при пониженной свертываемости крови. При повышенной свертываемости крови и образовании тромбов, в качестве лекарственных веществ, используются антагонисты витамина К – дикумарол и варфарин. Оба препарата блокируют образование протромбина и применяются для лечения тромбозов, инфаркта миокарда.

## **ТЕМА 2.2. ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ**

### *Задание для самоподготовки*

Составьте таблицу с указанием химического строения витаминов и их коферментов, биологической роли и других характеристик. Назовите лекарственные препараты, содержащие водорастворимые витамины либо их коферментативные структуры.



Название витамина (буквенное, химическое, физиологическое)	Химическая формула	Суточная доза	Биологическая роль	Биологически активная форма (кофермент)	Признаки гипо- и авитаминоза	Пищевые источники	Лекарственные формы

## Лабораторная работа 1

### Качественные реакции на водорастворимые витамины

#### Реактивы

1) 10% раствор NaOH, 2) конц. HCl, 3) 1% раствор FeCl<sub>3</sub>, 4) 10% раствор тиомочевины, 5) 10% CH<sub>3</sub>COOH, 6) 5% раствор Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, 7) изобутиловый спирт, 8) цинк металлический. 9) 5% раствор калия гексацианоферрата K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 10) порошок гидросульфита натрия, 11) 2,6-дихлорфенолиндофенол (краска Тильманса, 0,1%), 12) 10% HCl, 13) 10% раствор Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 14) 0,01% раствор метиленового синего, 15) 2% HCl.

#### Оборудование

Электроплитка, беззольные фильтры, ртутно-кварцевая лампа.

#### Материал исследования

6% р-р тиамин бромид, 5% раствор пиридоксина гидрохлорида, никотиновая кислота, таблетки рибофлавина, витамин B<sub>12</sub>,

#### А. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ТИАМИН

##### Принцип

В щелочной среде тиамин окисляется железосинеродистым калием в тиохром, который обладает интенсивной синей флуоресценцией в ультрафиолетовом свете.

*Материал исследования:* 5% раствор тиамин.

##### Проведение анализа

К 1-2 каплям раствора тиамин или 1-2 мг порошка прибавляют 5-10 капель раствора NaOH и 2 капли раствора K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], перемешивают. Нагревают и наблюдают флуоресценцию в лучах ртутно-кварцевой лампы.

## *Б. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА РИБОФЛАВИН*

### *Реакция флуоресценции*

Рибофлавин обладает окислительно-восстановительными свойствами. Это связано с наличием двойных связей в структуре изоаллоксазинового кольца, по месту разрыва которых могут присоединяться к азоту два протона и два электрона окисляемого субстрата.

#### *Принцип*

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

#### *Материал исследования*

1) 0,025% раствор рибофлавина, перед употреблением разводят в 5 раз, 2) 0,1% раствор рибофлавиннуклеотида в ампулах, из которого готовят 0,002% раствор, 3) флавионат в ампулах, содержащий 0,002% раствор ФАД.

#### *Проведение анализа*

В три пробирки вносят: В 1 пробирку – 10 капель рибофлавина, во 2 пробирку – 10 капель рибофлавинмононуклеотида, в 3 пробирку – 10 капель флавионата. Приливают в каждую по 5 мл дистиллированной воды. Перемешивают. Прибавляют в каждую пробирку на кончике скальпеля порошок натрия гидросульфита (восстановитель) и наблюдают за гашением флуоресценции. Сравнивают интенсивность флуоресценции в изучаемых объектах.

### *Реакция восстановления*

#### *Принцип*

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

#### *Материал исследования*

0,025% раствор рибофлавина, перед употреблением разводят в 5 раз,

*Проведение анализа*

К 10 каплям раствора витамина В<sub>2</sub> добавляют 5 капель концентрированной HCl и гранулу металлического цинка. Жидкость окрашивается в розовый цвет, а затем обесцвечивается.

*В. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА НИКОТИНОВУЮ КИСЛОТУ*

*Принцип*

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

*Материал исследования:* порошок никотинамида.

*Проведение анализа*

5-10 мг (щепотка) никотиновой кислоты помещают в пробирку с 10 каплями раствора уксусной кислоты и растворяют при нагревании. К нагретому до кипения раствору добавляют равный объем раствора уксуснокислой меди. Жидкость становится мутной. При стоянии и постепенном охлаждении раствора выпадает синий осадок медной соли никотиновой кислоты.

*Г. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ПИРИДОКСИН*

*Принцип*

Витамин В<sub>6</sub> с FeCl<sub>3</sub> образует комплексную соль красного цвета типа фенолята железа.

*Материал исследования*

1% раствор витамина В<sub>6</sub>.

*Проведение анализа*

К 5 каплям раствора витамина В<sub>6</sub> прибавляют равное количество раствора FeCl<sub>3</sub>. Развивается красное окрашивание.

*Д. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ЦИАНКОБАЛАМИН*

*Принцип*

При взаимодействии ионов кобальта, содержащихся в витамине, с тиомочевинной при нагревании образуется роданид кобальта зеленого цвета.

*Материал исследования:* минерализат витамина В<sub>12</sub>.

*Проведение анализа*

На беззольный фильтр наносят 2-3 капли тиомочевинны, высушивают над плиткой. Затем на фильтр наносят 1-2 капли минерализата витамина В<sub>12</sub> и вновь высушивают. На фильтре

по краям пятна появляется зеленое окрашивание, свидетельствующее о наличии кобальта.

### *Е. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА АСКОРБИНОВУЮ КИСЛОТУ*

#### *Принцип*

Аскорбиновая кислота обладает восстанавливающими свойствами и способна восстанавливать 2,6-дихлорфенолиндофенол, метиленовый синий и калия гексацианоферрат  $K_3Fe(CN)_6$ , окисляясь при этом до дегидроаскорбиновой кислоты. 2,6-Дихлорфенолиндофенол и метиленовый синий восстанавливаются до бесцветных лейкосоединений,  $K_3Fe(CN)_6$  до  $K_4Fe(CN)_6$ , который с ионами трехвалентного железа дает соль  $Fe_4[Fe(CN)_6]$  синего цвета.

*Материал исследования:* 1% раствор аскорбиновой кислоты.

#### *Проведение анализа*

*1 реакция.* К 10 каплям аскорбиновой кислоты прибавляют 10 капель калия гексацианоферрата  $K_3Fe(CN)_6$  и 5 капель  $FeCl_3$ . Наблюдают образование сине-зеленого окрашивания (берлинская лазурь).

*2 реакция.* В две пробирки вносят по капле метиленового синего. В первую прибавляют 5 капель аскорбиновой кислоты, во вторую 5 капель дистиллированной воды и ставят в водяную баню (+40°C). Через некоторое время в пробирке с витамином жидкость обесцвечивается.

#### *Оформление работы*

Отмечают принцип метода, регистрируют результаты анализа и делают вывод о наличии витаминов в образцах.

## Лабораторная работа 2

### **Количественное определение содержания витамина С в биологических объектах**

#### *Принцип*

Аскорбиновая кислота, содержащаяся в моче или вытяжке из растительного сырья, восстанавливает 2,6-дихлорфенолиндофенол. По количеству красителя, затраченному на титрование, определяют количество витамина С. Как только весь витамин С окислится, титруемый раствор приобретает розовую окраску за счет образования в кислой среде недиссоциированных молекул 2,6-дихлорфенолиндофенола.



### Проведение анализа

При выполнении работы использовать данные таблицы.

Исследуемый продукт	Навеска, г	Количество Н <sub>2</sub> О для экстракции	Вид фильтра	Общее количество экстракта, V <sub>1</sub>	Количество экстракта для анализа, V <sub>2</sub>
Картофель	5	20	Вата		10
Капуста свежая	5	20	Вата		10
Капуста квашеная	10	20	Вата		10
Морковь	5	15	Вата		1мл экстракта и 5 мл Н <sub>2</sub> О
Лук репчатый	5	20	Вата		10
Плоды шиповника	1	20	бумага		1мл экстракта и 5 мл Н <sub>2</sub> О

Приготовление экстракта витамина С: навеску исследуемого материала, помещают в ступку, измельчают и растирают в ступке с 5 мл 2% соляной кислоты, постепенно вливая дистиллированную воду согласно таблице. Оставляют на 5 минут.

Вытяжку фильтруют (тип фильтра определяют по таблице) в мерный цилиндр вместимостью 25 мл. Записывают общее количество экстракта (V<sub>1</sub>).

Для исследования берут часть экстракта (V<sub>2</sub>). Объем (согласно таблице) отмеривают мерной пробиркой и переносят в колбу для титрования.

Титруют краской Тильманса до розовой окраски, сохраняющейся в течение 30 секунд. Записывают объем краски, затраченной на титрование.

Рассчитывают содержание аскорбиновой кислоты в мг в 100 г продукта или 100 мл экстракта по формуле:

$$\text{Содержание аскорбиновой кислоты, мг} = \frac{0,088 \cdot A \cdot V_1 \cdot 100}{V_2 \cdot B}$$

где 0,088 – количество витамина С, соответствующее 1 мл 0,088 моль/л раствора краски Тильманса;

A – количество краски, затраченной на титрование (мл);

B – количество продукта, взятого для анализа.;

$V_1$  – общее количество экстракта, мл;  
 $V_2$  – объем экстракта, взятый для титрования;  
 100 – пересчет на 100 г (или мл) продукта.

Рассчитать количество продуктов, необходимое для удовлетворения суточной потребности в витамине С.

#### *Оформление работы*

Отмечают принцип методов, регистрируют результаты анализа. В выводах указать лучшие источники аскорбиновой кислоты.

## **ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ В МЕДИЦИНЕ**

*Витамин В<sub>1</sub>* широко применяется в медицинской практике для лечения различных нервных заболеваний (полиневрита, неврозов), сердечно-сосудистых расстройств (гипертонии, склероза коронарных сосудов) и др. Фосфорилированная форма витамина В<sub>1</sub> – кокарбоксилаза – применяется при патологических состояниях, связанных с нарушением углеводного обмена, почечной недостаточности, нарушениях коронарного кровообращения.

*Витамин В<sub>2</sub>*. В медицинской практике применяют как витамин В<sub>2</sub>, так и его коферментные формы. Исходный рибофлавин показан при гипо- и авитаминозах В<sub>2</sub>, при конъюнктивитах, язвах роговицы и катаракте. Рибофлавин-моноклеотид применяют при различных кожных заболеваниях, таких, как дерматозы, нейродермиты, себорея, фолликулярная волчанка. Флавинат (ФАД), помимо указанных выше заболеваний, применяют при отравлениях и токсикозах.

*Пантотеновая кислота* в медицинской практике используется в виде пантотената кальция при нарушениях обменных процессов, полиневритах, язвенных процессах, токсикозах.

*Витамин РР*. Никотиновую кислоту и никотинамид применяют при атеросклерозе, в частности при гиперхолестеринемии, для нормализации функций печени, почек, головного мозга. Среди комплексных препаратов, в состав которых входит никотиновая кислота, можно отметить никошпан, содержащий кроме никотиновой кислоты но-шпу (сосудорасширяющее и спазмолитическое средство), а среди производных никотиновой кислоты широкое применение в медицинской практике получил кордиамин (стимуляция функций нервной системы и дыхания).

*Витамин В<sub>6</sub>*. В медицинской практике используют как витамин В<sub>6</sub>, так и его коферментные формы. Пиридоксин применяют при

токсикозах у беременных, атеросклерозе, нервных и кожных заболеваниях. Пиридоксальфосфат более эффективен, особенно при кожных заболеваниях.

*Витамин В<sub>12</sub>* применяют для лечения некоторых видов анемий, причем наибольший эффект проявляется при сочетанном его применении с фолиевой кислотой. Кроме того, витамин В<sub>12</sub> показан при патологиях печени, нервной систем, кожных заболеваниях.

*Фолиевая кислота* в сочетании с витамином В<sub>12</sub> применяется для стимуляции эритропоэза, при отравлении тяжелыми металлами, развитии лучевой болезни. Антивитамины фолиевой кислоты, например 4-аминоптерин, применяют в комплексной терапии онкологических заболеваний для подавления синтеза ДНК в опухолевых клетках, а также при лейкозах для ингибирования лейкопоэза.

*Витамин С.* В медицинской практике витамин С применяется для лечения гиповитаминозов С, при кровотечениях, инфекционных заболеваниях, болезнях печени и почек. Аскорбиновая кислота обладает детоксицирующим действием при отравлениях анилином или оксидом углерода.

В ряде случаев витамины взаимно усиливают оказываемые ими физиологические эффекты. Так, влияние витамина Р на проницаемость сосудов усиливается под влиянием витамина С. Витамины С, Р и К обеспечивают нормальную проницаемость и устойчивость кровеносных сосудов, повышают свертываемость крови. Витамин С и А повышают устойчивость организма к инфекциям путем стимулирования выработки антител и противовоспалительных веществ, усиления защитных свойств эпителия, поэтому в медицинской практике используется ряд комбинированных препаратов в лечебных и профилактических целях.

### **СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ ПО РАЗДЕЛУ «СТРОЕНИЕ, КЛАССИФИКАЦИЯ И РОЛЬ ВИТАМИНОВ»**

1. Недостаточность какого витамина, проявляется развитием ксерофтальмии. Объясните причину?
2. Варфарин – препарат, применяемый для борьбы с грызунами, при его приеме у них возникают сильные кровотечения. Предположите механизм действия варфарина.
3. У больного нарушено переваривание липидов. Недостаточность каких витаминов следует ожидать? Почему?



4. У новорожденного обильные подкожные кровоизлияния, кровь в кале, носовые кровотечения. Недостаточность какого витамина наблюдается? Какие лекарственные препараты необходимо использовать? Почему?
5. Можно ли применять жирорастворимые витамины А и Д в один прием в таком количестве, которого достаточно для поддержания их нормального уровня в течение нескольких недель? Почему?
6. Какие симптомы наблюдаются при передозировке витамина Д? Суточная потребность в витамине?
7. Влияет ли внесенный в пробирку с кровью витамин К на свертывание крови? Почему?
8. У больного закупорка желчного протока. Предстоит операция. Какой витамин следует назначить до операции? Почему?
9. Больной плохо видит в сумерках, слабо ориентируется при переходе от света к темноте. Недостаток какого витамина наблюдается? Какие лекарственные препараты следует использовать? Почему?
10. Недостаточность каких витаминов следует ожидать при заболевании печени и желчного пузыря (нарушено переваривание липидов)? Почему?
11. Бактерии *Streptococcus faecalis*, обитающие в толстом кишечнике, нуждаются в фолиевой кислоте. Если в питательной среде содержатся аденин и тимин, то бактерии могут хорошо расти и при отсутствии фолиевой кислоты. Почему бактерии нуждаются в фолиевой кислоте?
12. Какая связь существует между анемией и пониженной секрецией желудочного сока?
13. У ребенка после длительного употребления сырых яиц развился дерматит. Укажите причину и рекомендуйте лекарственный препарат.
14. В конце 19-го и начале 20-го столетия пеллагра была довольно распространенным заболеванием, особенно в сельских местностях на юге Европы и США, где люди употребляли в пищу мало мяса, а питались в основном кукурузой. Объясните, почему такое питание приводило к недостаточности никотиновой кислоты?
15. Почему при лечении антибиотиками и сульфаниламидами необходимо назначать поливитамины?
16. Через год после резекции желудка у больного развилась анемия. Укажите причину и рекомендуйте лекарственный препарат.

17. Суточная потребность взрослого человека в никотиновой кислоте уменьшается, если в пище содержится большое количество аминокислоты триптофана. Что можно сказать о метаболической взаимосвязи между никотиновой кислотой и триптофаном?
18. Недостаточность какого витамина сопровождается развитием эпилептиформных припадков? Почему?
19. У больных с хроническими заболеваниями печени и желчевыводящих путей нередко развивается остеомаляция (размягчение костей с деформацией скелета). Назовите возможный механизм этого осложнения.

## РАЗДЕЛ 3. ФЕРМЕНТЫ

### ТЕМА 3.1. СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ

#### *Актуальность*

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

#### *Цель*

Изучение классификации ферментов, особенностей ферментативного катализа и исследование практически путем их свойств. Знакомство с методами обнаружения ферментов в тканях и биологических жидкостях.

#### *Вопросы для самоподготовки*

1. Представление о катализе (энергетический барьер, энергия активации и др.). Укажите роль ферментов в катализе.
2. Структурная организация ферментов (апофермент, кофактор, кофермент, холофермент).
3. Назовите классификацию кофакторов и их роль в катализе.
4. Функциональная организация ферментов (активный, аллостерический центры).
5. Назовите этапы механизма ферментативного катализа, принципы теории Фишера «ключ-замок», Кошленда «рука-перчатка» или (индуцированного соответствия).
6. Назовите сходство и отличие в действии ферментов и неорганических (небиологических) катализаторов.
7. Охарактеризуйте основные свойства ферментов: специфичность, термолабильность, зависимость активности от pH среды и др.
8. Назовите особенности кинетики ферментативного катализа в зависимости от изменения количества фермента и субстрата в клетке.
9. Назовите и охарактеризуйте способы регуляция ферментативной активности (аллостерические механизмы, ковалентная модификация и др.).
10. Назовите виды ингибирования их особенности, а также применение ингибиторов ферментов в качестве лекарственных препаратов.

11. Укажите принципы современной номенклатуры и классификации ферментов.
12. Дайте общую характеристику ферментам разных классов, назовите основные подклассы, биологическую роль.
13. Назовите принципы количественного определения активности ферментов. Укажите единицы активности ферментов.
14. Энзимотерапия. Назовите практическое использование ферментов и их ингибиторов в медицине.
15. Энзимодиагностика. Ферменты как аналитические реагенты. Назовите преимущества иммобилизованных ферментов.
16. Назовите причины возникновения первичных и вторичных энзимопатий. Приведите примеры.

Лабораторная работа 1  
**Зависимость скорости ферментативной  
реакции от температуры**

*Реактивы*

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

*Материал исследования*

Слюна, разведенная 1:10 (источник  $\alpha$ -амилазы).

*Принцип*

Гидролиз крахмала под действием амилазы проходит через стадии образования декстринов до дисахарида мальтозы. Нерасщепленный крахмал с йодом дает синее окрашивание. Декстрины в зависимости от размера молекул дают с йодом окрашивание: амилодекстрины – фиолетовое, эритродекстрины – красно-бурое, ахродекстрины и мальтоза – цветная реакция отсутствует, желтый цвет соответствует цвету водного раствора йода.

*Проведение анализа*

Приготовление раствора амилазы производят путем разведения слюны в соотношении 1:10 (собирают 1 мл слюны в центрифужную пробирку и доводят дистиллированной водой до метки 10 мл) хорошо перемешивают.

Затем в четыре пробирки (1, 2, 3, 4) вносят по 10 капель крахмала. В следующие 4 пробирки (5, 6, 7, 8) вносят по 10 капель разведенной слюны (раствор  $\alpha$ -амилазы). Пробирки делят по парам – 1-5, 2-6, 3-7, 4-8 и размещают в разных температурных условиях:

- первую пару пробирок помещают в баню со льдом (0°C);
- вторую пару оставляют при комнатной температуре (20°C);

- третью пару помещают в водяную баню при  $t=38-40^{\circ}\text{C}$ ;
- четвертую – в кипящую водяную баню ( $100^{\circ}\text{C}$ ).

Через 10 мин содержимое каждой пары пробирок объединяют, перемешивают и инкубируют еще 10 мин в тех же условиях.

По окончании инкубирования из третьей пробирки отбирают на предметное стекло 3 капли смеси и добавляют 1 каплю реактива Люголя. Если появится красное или желтое окрашивание (эритродекстрин, мальтоза), то это указывает на завершение гидролиза крахмала амилазой.

Для выявления результата анализа в каждую пробирку добавляют 2 капли реактива Люголя и наблюдают за появлением окраски, на основании которой делают вывод о скорости ферментативной реакции.

#### *Оформление работы*

Результаты анализа оформляют в виде таблицы:

<b>№ проб</b>	<b>Температура инкубации</b>	<b>Окраска с йодом</b>	<b>Скорость реакции</b>
1	$0^{\circ}\text{C}$		
2	$20^{\circ}\text{C}$		
3	$38-40^{\circ}\text{C}$		
4	$100^{\circ}\text{C}$		

### Лабораторная работа 2

#### **Специфичность действия ферментов**

##### *Реактивы*

1) 1% раствор мочевины, 2) 1% раствор тиомочевины, 3) 0,5% спиртовый раствор фенолфталеина, 4) лакмусовая бумага, 5) препарат фермента уреазы, 6) 1% раствор крахмала, 7) 1% раствор сахарозы, 8) реактив Фелинга: 10 капель реактива Фелинг I и 10 капель реактива Фелинг II, готовят ex tempore.

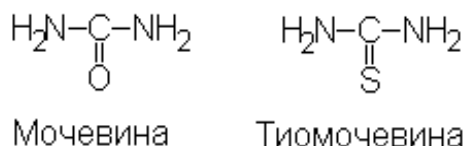
##### *Материал исследования*

Препарат уреазы; слюна, разведение 1:10 (источник  $\alpha$ -амилазы).

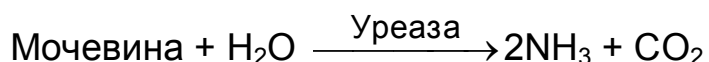
#### **А. ОБНАРУЖЕНИЕ АБСОЛЮТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТА УРЕАЗЫ**

##### *Принцип*

Метод основан на сравнении возможности гидролиза уреазой субстратов, сходных по строению мочевины и тиомочевины.



Действие фермента обнаруживается по изменению окраски индикаторов: фенолфталеина или лакмусовой бумажки в присутствии аммиака, который образуется при гидролизе мочевины ферментом уреазой.



#### *Проведение реакции*

Приготовление раствора уреазы (очистить 3-4 семечка арбуза, зерна растереть в ступке в 1 мл дистиллированной воды, затем довести объем до 10 мл). Полученную эмульсию фильтруют через двойной слой марли и используют как препарат фермента уреазы.

Затем берут две пробирки: в одну добавляют 10 капель раствора мочевины; в другую – 10 капель раствора тиомочевины.

В каждую пробирку вносят по 10 капель препарата уреазы и по 1-2 капли фенолфталеина. Перемешивают.

Через несколько минут наблюдают за появлением розовой окраски в одной из пробирок.

### **Б. ОБНАРУЖЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ ДЕЙСТВИЯ АМИЛАЗЫ СЛЮНЫ**

#### *Принцип*

Метод основан на сравнительном изучении способности фермента амилазы гидролизовать разные углеводные субстраты: полисахарид крахмал и дисахарид сахарозу. Действие фермента на субстрат выявляют при помощи качественной реакции на свободную альдегидную группу углеводов (реакция Фелинга). Крахмал и сахароза не имеют свободной альдегидной группы, поэтому не дают положительной реакции с реактивом Фелинга. Однако при действии амилазы крахмал может гидролизаться до мальтозы, которая имеет свободную альдегидную группу и обладает восстанавливающими свойствами.

#### *Проведение реакции*

Приготовление раствора амилазы (собирают 1 мл слюны в центрифужную пробирку и доводят дистиллированной водой до метки 10 мл, хорошо перемешивают).

Берут две пробирки: в одну добавляют 10 капель крахмала, в другую – 10 капель раствора сахарозы.

Затем в каждую пробирку по 5 капель разбавленной слюны, перемешивают и ставят в водяную баню (37°C) на 10 минут.

Выявляют результат гидролиза путем использования реакции Фелинга: к 5 каплям исследуемого раствора добавляют 3 капли реактива Фелинга, приготовленного самостоятельно (см выше). Пробирки нагревают до кипения и кипятят 1 минуту. Сравнивают окраску в пробирках.

#### *Оформление работы*

Отмечают принцип метода, регистрируют результаты анализа и делают вывод о специфичности действия уреазы и  $\alpha$ -амилазы.

### Лабораторная работа 3 Влияние активаторов и ингибиторов на активность амилазы

#### *Принцип*

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

#### *Реактивы*

1) 1% раствор  $\text{CuSO}_4$ , 2) Раствор Люголя, 3) 0,9% раствор  $\text{NaCl}$ .

#### *Материал исследования:*

Слюна, разведенная 1:10 (источник  $\alpha$ -амилазы).

#### *Проведение реакции*

Приготовление разведенной слюны 1:10: собирают 1 мл слюны в центрифужную пробирку и доводят дистиллированной водой до метки 10 мл, хорошо перемешивают.

Затем берут три пробирки. В первую добавляют 10 капель дистиллированной воды, во вторую – 10 капель раствора  $\text{NaCl}$ , в третью – 10 капель раствора  $\text{CuSO}_4$ .

После чего в каждую пробирку добавляют по 10 капель разбавленной слюны, перемешивают и добавляют по 10 капель раствора крахмала.

Пробирки ставят в водяную баню (37°C) на 5 минут.

Для выявления результата работы готовят три пробирки с водой по 1 мл в каждой, добавляют 1-2 капли реактива Люголя и прибавляют по 5 капель содержимого опытных пробирок. Сравнивают окраску в пробирках. Если существенной разницы в

окраске нет, то инкубацию опытных проб увеличивают до 10-15 минут.

### *Оформление работы*

Отмечают принцип метода, регистрируют результаты анализа и делают вывод о влиянии ионов хлора и меди на активность  $\alpha$ -амилазы.

## ТЕМА 3.2. КЛАССИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ

По типу катализируемой реакции все ферменты делят на шесть классов.

### *I КЛАСС. ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ*

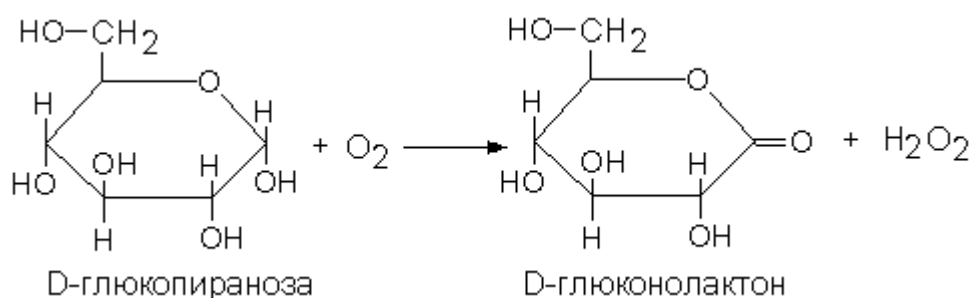
Ферменты катализируют окислительно-восстановительные реакции, лежащие в основе биологического окисления. Класс насчитывает 17 подклассов.

Подклассы.

**1.1. Дегидрогеназы:** ферменты катализирующие реакции переноса атомов водорода.

а) Аэробные дегидрогеназы (катализируют перенос протонов и электронов непосредственно на кислород). Коферментами аэробных дегидрогеназ являются ФАД (флавинадениндинуклеотид) и ФМН (флавинмононуклеотид).

*Пример:*



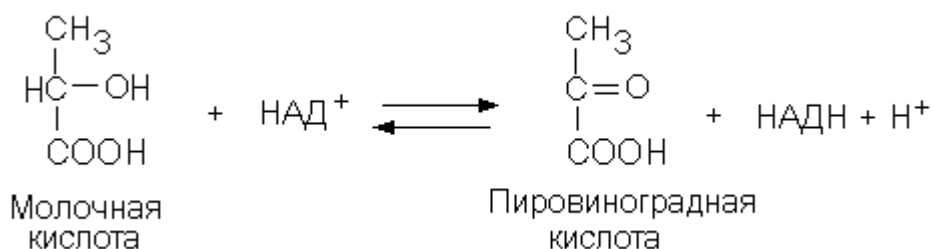
Фермент: глюкозооксидаза

Кофермент: ФАД

Витамин: рибофлавин (В<sub>2</sub>)

б) Анаэробные дегидрогеназы катализируют перенос протонов и электронов на промежуточный субстрат, но не на кислород. Коферментами анаэробных дегидрогеназ являются НАД (никотинамиддинуклеотид) и ФАД.

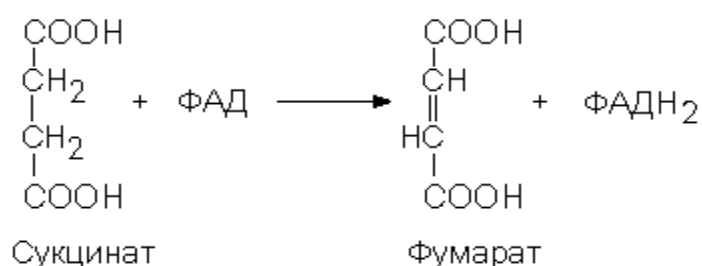


**Пример 1**

Фермент: лактатдегидрогеназа

Кофермент: НАД

Витамин: никотинамид (РР)

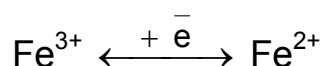
**Пример 2**

Фермент: сукцинатдегидрогеназа

Кофермент: ФАД

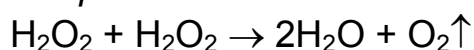
Витамин: рибофлавин (В<sub>2</sub>)

**1.2. Цитохромы** – ферменты, катализирующие перенос электронов. Являются по химическому строению гемопротеинами, отличающимися друг от друга не только строением белкового компонента, но и простетическими группами. В ходе каталитического процесса валентность железа, входящего в состав гема цитохромов, обратимо изменяется:

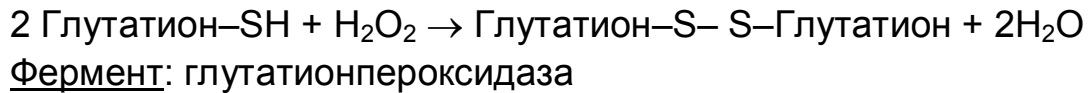


Цитохромы b, c<sub>1</sub>, c, a и a<sub>3</sub> выполняют функцию переноса электронов в митохондриях дыхательной цепи. Цитохром P<sub>450</sub> – компонент микросомальной цепи окисления.

**1.3. Каталаза и пероксидаза** – ферменты, катализирующие разложение пероксида водорода. Эти ферменты являются сложными белками-гемопротеинами. Пероксидазы для своей работы нуждаются в присутствии субстрата – донора водорода.

**Пример 1**

Фермент: каталаза

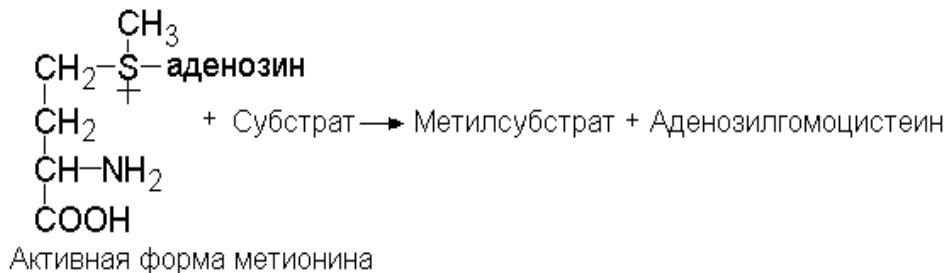
**Пример 2****II КЛАСС. ТРАНСФЕРАЗЫ**

Катализируют реакции переноса различных групп от одного субстрата (донор) к другому (акцептор), участвуют в реакциях взаимопревращений различных веществ, обезвреживания природных и чужеродных соединений.

Класс насчитывает около 200 ферментов, подразделяется на 8 подклассов в зависимости от строения переносимых ими групп.

Подклассы.

2.1. Ферменты, переносящие одноуглеродные остатки: метила (-CH<sub>3</sub>), формила (-COH), метилена (=CH<sub>2</sub>). и др.

**Пример**

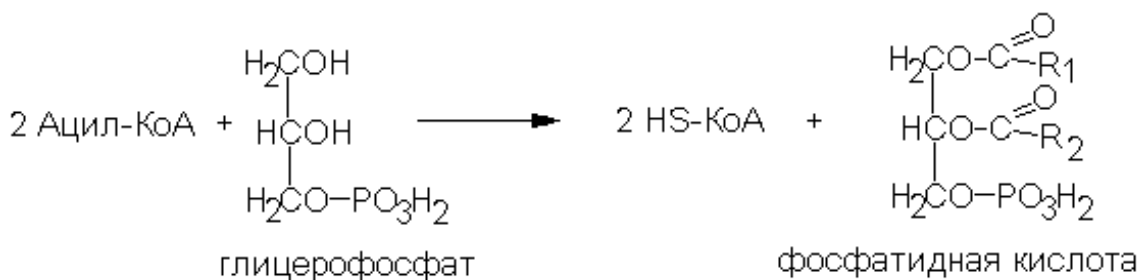
Фермент: Метилтрансфераза.

Кофермент: Тетрагидрофолиевая кислота.

Витамин: Фолиевая кислота (B<sub>9</sub>)

Биохимическая функция: Синтез медиаторов нервной ткани: ацетилхолина, катехоламинов, а также других веществ: креатина, фосфатидилхолина.

**2.2. Ацилтрансферазы**: переносят ацильный остаток на другое вещество.

**Пример**

Фермент: Ацилтрансфераза.

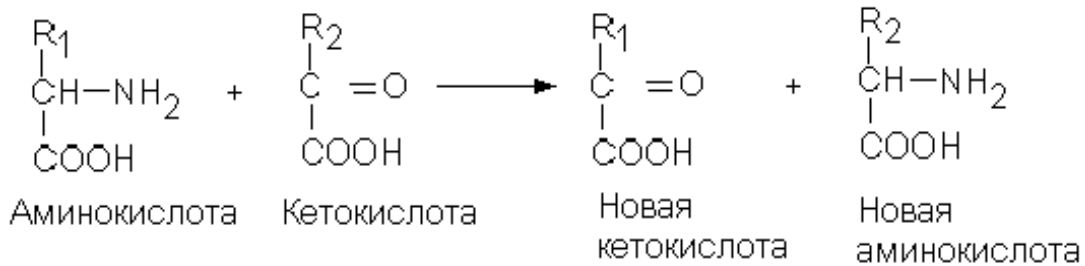
Кофермент: Кофермент А

Витамин: Пантотеновая кислота (В<sub>5</sub>)

Биохимическая функция: Синтез нейтрального жира, превращение свободных жирных кислот и т.д.

**2.3. Аминотрансферазы:** катализируют реакции трансаминирования – переноса аминогрупп с α-аминокислоты на α-кетокислоту.

*Пример*



Фермент: Аминотрансфераза

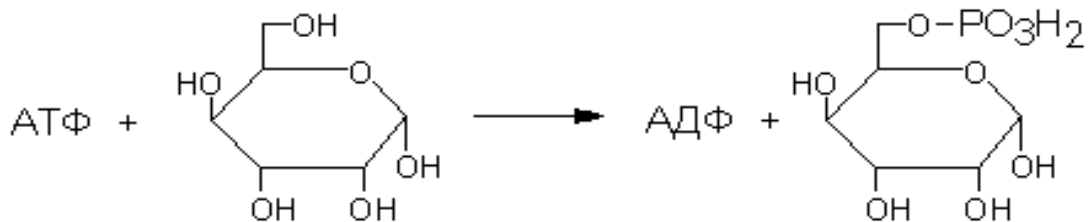
Кофермент: Пиридоксальфосфат.

Витамин: Пиридоксин (В<sub>6</sub>)

Биохимическая функция: Важнейшие ферменты метаболизма свободных аминокислот. Определяются в клинике для диагностических целей. Так, активность аланинаминотрансферазы (АлАТ) определяется для диагностики вирусного гепатита, активность аспартатаминотрансферазы (АсАТ)- при инфаркте миокарда.

**2.4. Фосфотрансферазы (киназы).** Перенос остатка фосфорной кислоты АТФ на другие вещества.

*Пример*



Фермент: Гексокиназа

Кофермент: Кофактор Mg<sup>2+</sup>

Биохимическая функция: В результате действия киназ в организме синтезируются многочисленные фосфорилированные соединения.

### III класс. Гидролазы

Гидролазы – ферменты, осуществляющие разрыв внутримолекулярных связей в субстрате (за исключением С-С связей) путем присоединения элементов  $H_2O$ . Класс насчитывает около 460 ферментов, подразделяется на 11 подклассов.

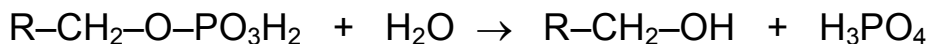
Гидролазы сосредоточены в основном в желудочно-кишечном тракте и в лизосомах клеток тканей. Осуществляют распад макромолекул, образуя легко абсорбируемые мономеры.

Подклассы.

**3.1. Эстеразы** – ферменты, гидролизующие сложноэфирные связи.

а) Фосфоэстеразы или фосфатазы – гидролизуют сложноэфирные связи, образованные спиртами и фосфорной кислотой. К ним относятся кислые и щелочные фосфатазы (малоспецифичны), 1,6-фруктозобисфосфатаза (высокоспецифична).

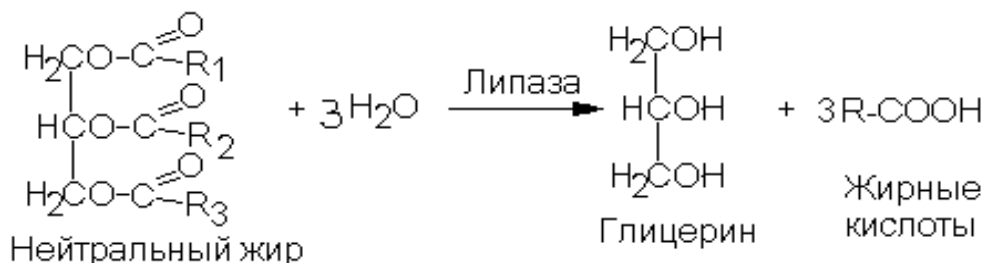
*Пример*



Применение в медицине: Активность фосфатаз определяется для диагностических целей. Активность щелочной фосфатазы (ЩФ) увеличивается в сыворотке крови при ряде заболеваний костной ткани (рахит, остеосаркома, метастазы опухоли в кости), активность кислой фосфатазы (КФ) увеличивается в сыворотке крови при раке предстательной железы.

б) Карбоксиэстеразы осуществляют гидролиз слжных эфиров, образованных спиртами и органическими кислотами.

*Пример:*



Биохимическая функция: Активность липазы, фосфолипазы резко повышается в крови при поражениях поджелудочной железы.

**3.2. Гликозидазы** – ферменты, расщепляющие связи в углеводах.

К гликозидазам относят  $\alpha$ -амилазу (слюнную и поджелудочную), осуществляющую гидролиз  $\alpha$ -1,4-гликозидной связи в крахмале, гликогене и т.д.

Применение в медицине: Диагностика нарушения функции поджелудочной железы. При воспалении поджелудочной железы активность  $\alpha$ -амилазы увеличивается в крови и моче.

**3.3. Пептидгидролазы** – ферменты, гидролизующие пептидные связи.

а) Эндопептидазы гидролизуют внутренние пептидные связи в белковой молекуле.

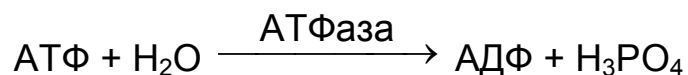
К эндопептидазам относят пепсин – фермент желудочного сока; катепсин I – фермент, аналогичный пепсину, находится в лизосомах клетки; трипсин – фермент панкреатического сока; катепсин II – лизосомальный аналог трипсина; химотрипсин – фермент панкреатического сока.

б) Экзопептидазы гидролизуют внешние пептидные связи в белковой молекуле (отщепляют концевые аминокислоты в пептидной цепи).

К экзопептидазам относят: аминопептидазы – разрывают пептидную связь с N-конца пептида, карбоксипептидазы – отщепляют аминокислоту с C-конца пептида.

**3.4. Полифосфатазы** – ферменты, гидролизующие фосфорно-ангидридные связи.

Примером полифосфатаз является фермент аденозинтрифосфатаза (АТФ-аза):



#### *IV класс. Лиазы*

Лиазы – ферменты, катализирующие разрыв C–O, C–C, C–N и других связей, а также обратимые реакции отщепления различных групп субстратов не гидролитическим путем. Эти реакции сопровождаются образованием двойной связи или присоединением групп к месту двойной связи. Класс насчитывает около 230 ферментов. Лиазы – сложные ферменты.

Подклассы.

**4.1. Лиазы, разрывающие связь C–C.**

*Пример*

Фермент: Пироватдекарбоксилаза

Кофермент: Тиаминдифосфат (ТДФ)

Витамин: Тиамин (В<sub>1</sub>)

Биохимическая функция: Ферменты участвуют в синтезе и распаде промежуточных продуктов обмена с образованием конечных продуктов: CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, NH<sub>3</sub>.

#### 4.2. Лиазы, разрывающие связь C–O.

*Пример*

Фермент: Карбоангидраза

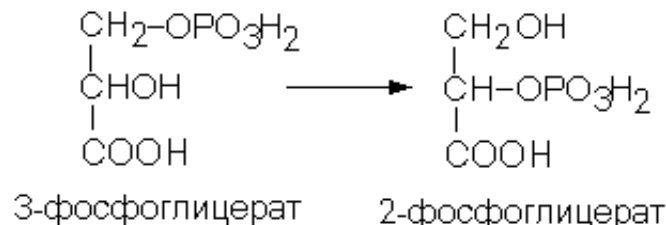
Кофермент: Содержит Zn.

#### V КЛАСС. ИЗОМЕРАЗЫ

Изомеразы – ферменты, катализирующие изомерные превращения в пределах одной молекулы. Класс насчитывает более 80 ферментов. Изомеразы – сложные ферменты. К их коферментам относятся пиридоксальные, кобамидные, пептидные (глутатион), фосфаты моносахаридов (глюкозо-1,6-дифосфат) и др.

Подклассы.

#### 5.1. Мутазы – внутримолекулярные трансферазы.

*Пример*

Фермент: Фосфоглицеромутаза

Биохимическая функция: Изменение биологической активности молекул, переключение использования метаболитов на различных путях обмена веществ.

## 5.2. Внутримолекулярные оксидоредуктазы

*Пример*



Фермент: Триозофосфатизомераза

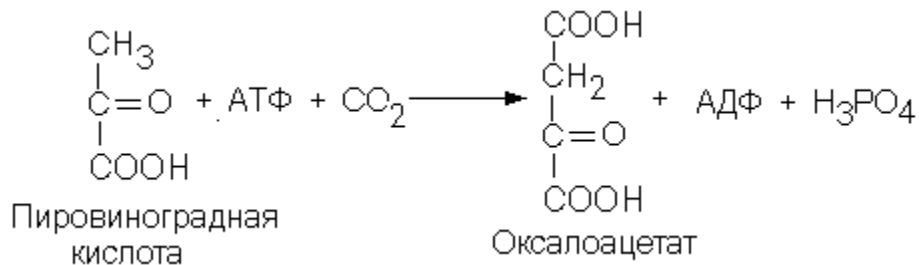
*VI класс. ЛИГАЗЫ*

Лигаза (синтетаза) – ферменты, катализирующие присоединение друг к другу двух молекул с использованием энергии высокоэнергетических связей АТФ (или других макроэргов). Лигаза – сложные ферменты. Они содержат нуклеотидные, биотиновые (витамин Н), фолиевые коферменты.

Подклассы.

6.1. Ферменты, синтезирующие С–С связи.

*Пример*



Фермент: Пироваткарбоксилаза

Биохимическая функция: синтез веществ в клетке: нуклеотидов, мочевины, гема и др.

### Лабораторная работа 1

#### Качественные реакции обнаружения ферментов в биологических объектах

##### *А. ВЫЯВЛЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ КАТАЛАЗЫ*

*Реактивы*

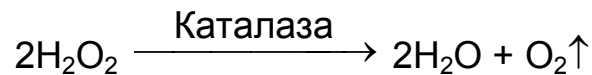
3% раствор  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Готовить ex tempore.

*Материал исследования*

Свежая кровь – источник фермента каталазы.

*Принцип*

Каталаза ускоряет реакцию расщепления пероксида водорода:



В этой реакции одна молекула пероксида водорода окисляется и служит донором электронов, а другая восстанавливается и является акцептором электронов. Фермент выявляется по появлению пузырьков кислорода.

*Проведение анализа*

В две пробирки вносят по 10 капель пероксида водорода. В одну из пробирок добавляют 1 каплю крови, в другую – не добавляют. Сравнивают полученные результаты и объясняют их.

**Б. ОБНАРУЖЕНИЕ АНАЭРОБНЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ В ДРОЖЖАХ**

*Реактивы*

1) 10% раствор глюкозы, 2) метиленовый синий.

*Материал исследования*

Кипяченые и некипяченые пекарские дрожжи.

*Принцип*

Анаэробные дегидрогеназы дрожжей – сложные ферменты, их коферментами являются ФАД и НАД. Они катализируют реакции переноса атомов водорода от альдегидов, альдегидоспиртов на промежуточный субстрат (акцептор). Обнаружение дегидрогеназ проводится по изменению окраски (обесцвечиванию) добавленного к суспензии дрожжей метиленового синего (акцептора), который при восстановлении обесцвечивается.

*Проведение анализа*

Берут две пробирки. В первую наливают 10 капель суспензии кипяченых дрожжей, во вторую – 10 капель некипяченых дрожжей. В обе пробирки добавляют по 10 капель 10% раствора глюкозы и 1-2 капли метиленового синего. Пробирки закрывают пробками и помещают в водяную баню при 30°C. Наблюдаем изменение окраски в одной пробирке.

*Оформление работы*

Отмечают принцип метода, результаты вносят в таблицу.



Материал исследования	Фермент, его класс	Катализируемая реакция	Субстрат реакции	Как обнаруживается фермент

## Лабораторная работа 2

### Количественное определение активности ферментов

Единицы измерения активности ферментов. Активность ферментов определяют, используя методы спектрофотометрии, полярографии, фотометрии обычно по убыли субстрата или по образованию конечного продукта реакции за определенный промежуток времени. Активность ферментов принято выражать в условных единицах, так как ничтожно малая концентрация их, сложность выделения и идентификация затрудняют измерение их абсолютных величин.

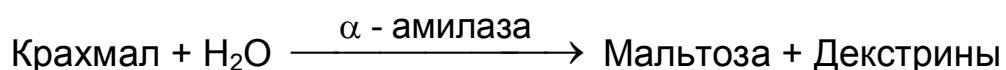
За международную единицу активности фермента (Е) принимают такое его количество, которое способно превратить 1 мкмоль субстрата за 1 минуту при 37°C и других оптимальных условиях. Концентрацию фермента в растворе выражают в международных единицах в расчете на 1 мл или 1 л (Е/мл, Е/л). Например, если при инкубации 0,5 мл экстракта печени с раствором аргинина за 15 мин разложилось 120 мкмоль аргинина, это означает, что в 0,5 мл экстракта содержится  $120/15=8Е$  фермента аргиназы. Если в 0,5 мл экстракта содержится 8Е аргиназы, то ее активность равна  $8/0,5=16 Е/мл$  или 1600 Е/л.

Часто бывает необходимость выражать активность ферментов не в расчете на объем раствора, а в расчете на содержание белка. Так получают удельную активность фермента, которая выражается в единицах активности на 1 мг белка (Е/мг). Например, если в 0,5 мл экстракта, содержащего 8 Е аргиназы, обнаружено 20 мг белка, то удельная активность равна  $8/20=0,4Е/мг$ .

#### *КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ*

#### *АКТИВНОСТИ $\alpha$ -АМИЛАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И МОЧЕ*

$\alpha$ -Амилаза (диастаза, 1,4- $\alpha$ -D-глюкангидролаза, КФ 3.2.1.1.) катализирует гидролиз  $\alpha$ -1,4-глюкозидных связей крахмала и гликогена до мальтозы и декстринов.



У здорового человека в крови в небольшом количестве содержится амилаза двух изоферментных типов: панкреатический –

P-тип (около 30%) и слюнной – S-тип (около 70%), которые попадают в кровь в результате естественного старения и отмирания клеток слюнных желез и поджелудочной железы. Фермент имеет относительно низкую молекулярную массу (около 48000 Д), фильтруется в почечных клубочках и присутствует в моче. Соотношение изоферментов в моче иное, чем в крови: P-тип – 70%, S-тип – до 30 %.

#### *Реактивы*

1) Фосфатный буфер, pH 7,0, 2) крахмальный субстрат, 3) 9 ммоль/л раствор NaCl, 4) осаждающий раствор: 1,85 ммоль/л MgSO<sub>4</sub>, сульфосалициловая кислота (2 ммоль/л).

#### *Материал исследования*

Сыворотка крови, моча

#### *Принцип*

$\alpha$ -Амилаза катализирует гидролиз нерастворимого цветного крахмального субстрата с образованием синего, растворимого в воде красителя. Количество освобожденного красителя пропорционально каталитической активности фермента.

#### *Проведение анализа:*

	<b>ОПЫТ 1, мл</b>	<b>ОПЫТ 2, мл</b>
Суспензия субстрата	1,0	1,0
	Инкубируют при 37°C в течение 5 мин	
Сыворотка	0,10	–
Моча	–	0,05
	Инкубируют точно 15 мин при 37°C .	
Осаждающий раствор	2,0	2,0
	Через 15 мин центрифугируют в течение 5 мин при 3000 об/мин (или фильтруют через вату). Измеряют оптическую плотность надосадочной жидкости против воды на зеленом светофильтре.	

*Расчет*

Активность фермента в сыворотке крови находят по приложенной калибровочной таблице, исходя из полученной оптической плотности.

Оптическая плотность	Активность фермента (Е/л)	Оптическая плотность	Активность фермента (Е/л)
0,046.....	40	0,402.....	400
0,068.....	60	0,449.....	450
0,089.....	80	0,495.....	500
0,110.....	100	0,501.....	550
0,120.....	110	0,587.....	600
0,130.....	120	0,679.....	700
0,150.....	140	0,769.....	800
0,170.....	160	0,859.....	900
0,190.....	180	0,948.....	1000
0,210.....	200	1,037.....	1100
0,229.....	220	1,125.....	1200
0,259.....	250	1,212.....	1300
0,288.....	280	1,473.....	1600
0,307.....	300	1,645.....	1800
0,354.....	350	1,816.....	2000

При определении активности фермента в моче полученную по таблице каталитическую активность необходимо умножить на 2.

Если проба имеет высокую активность, ее разбавляют физиологическим раствором, определение проводят снова, а результат умножают на разведение.

*Нормальные величины*

Сыворотка                    140-350 Е/л

Моча                            1000-2000 Е/л

*Клинико-диагностическое значение*

Повышение активности фермента происходит главным образом при заболеваниях поджелудочной железы. При остром панкреатите активность в крови и моче возрастает в 10-30 раз. Возрастание активности фермента выявляется при беременности, почечной недостаточности, кишечной непроходимости, заболеваниях желчных путей, диабетическом кетоацидозе, некоторых опухолях легких и яичников, поражении слюнных желез.

### *Оформление работы*

Отмечают принцип метода, регистрируют результаты анализа и делают вывод о возможной патологии.

## **ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ В МЕДИЦИНЕ И ФАРМАЦИИ**

### *1. Ферменты как лекарственные препараты*

Перспективной областью энзимологии, является энзимотерапия – использование ферментативных препаратов с целью лечения. Она развивается по следующим направлениям:

- применение ферментов в качестве заместительной терапии,
- в качестве неспецифических лечебных средств, преимущественно для удаления нежизнеспособных тканей,
- парентеральное применение ферментативных препаратов,
- использование ингибиторов ферментов.

Заместительная энзимотерапия назначается при наличии признаков ферментативной недостаточности. В состав препаратов, используемых для лечения заболеваний ЖКТ, входят энзимы – гидролазы животного и растительного происхождения. Для медицинских целей применяют ферменты, получаемые из поджелудочной железы крупного рогатого скота и свиней, такие как, пепсин, трипсин, химотрипсин, а также их смеси (абомин, химопсин).

Помимо протеиназ, ряд других ферментов, в частности РНКазы, ДНКазы, гиалуронидаза, коллагеназы, эластазы, отдельно или в смеси с протеиназами используются для местной обработки ран, воспалительных очагов, ожогов, устранения отеков, гематом, келоидных рубцов.

Одним из направлений энзимотерапии является парентеральное использование ферментов в сочетании с другой терапией (элементы комплексной терапии). Как препараты системной терапии ферменты обладают рядом положительных эффектов:

- оказывают положительное влияние на свойства крови (энзимы повышают эластичность эритроцитов и снижают агрегационную способность тромбоцитов, что улучшает «текучесть» крови);
- ускоряют рассасывание возникших отеков, т. е. при сосудистом застое протеолитические энзимы расщепляют белковые вещества, являющиеся причиной отеков, и препятствуют просачиванию жидкости из сосудов в ткани;

- оказывают обезболивающее действие, в результате расщепления веществ, вызывающих боль, а также в связи с уменьшением отека и улучшением снабжения ткани кислородом;
- обладают противовоспалительным действием, ускоряют течение процесса воспаления и, таким образом, поддерживают процесс заживления;
- проявляют иммуномодулирующее действие, в случае ослабления иммунитета энзимы способны повысить активность иммунных клеток и некоторых их продуктов;
- оказывают эффект потенцирования, т.е. отдельные протеолитические энзимы и их комбинации повышают концентрацию некоторых антибиотиков и химиотерапевтических препаратов в крови и улучшают их проникновение в ткани.

Таким образом, основная особенность ферментативных препаратов, обуславливающая их широкое применение в медицине, заключается в способности влиять на патологический иммунный ответ организма на внешние и внутренние факторы, практически не подавляя нормальных физиологических реакций.

В настоящее время ферментативные препараты успешно применяются во всех областях медицины:

- в неврологической практике при лечении нарушений мозгового кровообращения и рассеянного склероза,
- в гастроэнтерологии – при лечении токсических и воспалительных заболеваний печени,
- в урологии и нефрологии – при лечении заболеваний почек и мочевого пузыря,
- в хирургии – при операциях по поводу гнойно-воспалительных процессов,
- в травматологии и ортопедии – при лечении острых травм и эндопротезировании,
- в онкологии – при проведении неадъювантной полихимиотерапии,
- при лечении сердечно-сосудистых заболеваний.

Ферментативные препараты применяют при тромбозах и тромбоэмболиях. С этой целью используют препараты фибринолизина, стрептолиазы, урокиназы. Калликреины – ферменты кининовой системы – используют для снижения кровяного давления.

Важной областью энзимотерапии является применение ингибиторов ферментов. Например, ингибиторы протеиназ используются при острых панкреатитах, артритах, аллергических заболеваниях, ВИЧ-инфекции.

Несмотря на свою эффективность, энзимотерапия имеет много ограничений из-за их высокой иммуногенности, лабильности и трудности доставки к пораженным органам. Однако в настоящее время разработаны методы иммобилизации ферментов, что помогает предотвратить подобные трудности.

Иммобилизация означает взаимодействие ферментов или их активных фрагментов с растворимыми или нерастворимыми носителями, в результате чего происходит ограничение движения ферментов в пространстве.

Иммобилизованные ферменты имеют ряд преимуществ в использовании. Так, применение этих ферментов позволяет создавать при одномоментном введении препарата длительную устойчивую концентрацию его в крови, либо в определенной области сосудистой системы. В настоящее время получен и экспериментально изучен целый ряд иммобилизованных ферментов – стрептокиназа, фибринолизин, трипсин, урокиназа и др. Для лечения суставов применяют препараты лидазу или ринидазу, содержащие фермент гиалуронидазу, ускоряющий гидролиз гиалуроновой кислоты. Этот фермент получают из семенников крупного рогатого скота. Для ликвидации тромбозов (закупорки) кровеносных сосудов путем растворения тромбов применяют иммобилизованные тромболитические ферменты, в частности, фибринолизин, тромболитин (комплекс трипсина и гепарина). Важным преимуществом иммобилизованных ферментов является возможность адресной доставки. Например, используется направленный транспорт ферментов, заключенных в микроконтейнеры (тени эритроцитов, лизосомы и др.) к внешней поверхности которых могут быть прикреплены адресные белковые молекулы (например, иммуноглобулины-антитела против специфических компонентов органа или ткани-мишени, в частности опухоли). Иммобилизованные ферменты, в качестве лекарственных средств, начали применять в специальных колонках для экстракорпоральной перфузии крови (типа «искусственной почки»). Такое лечение полностью исключает нежелательные воздействия на организм чужеродного белка и может проводиться в течение длительного времени.

## *2. Использование ферментов в клинко-диагностических лабораториях*

Ферменты в медицинской практике нашли применение в качестве диагностических средств. Этот раздел энзимологии принято называть энзимодиагностикой.

Энзимодиагностика заключается в постановке диагноза заболевания (или синдрома) на основе определения активности ферментов и изоферментов в биологических жидкостях человека. Чаще всего в качестве диагностических тестов применяют ферменты, циркулирующие в плазме крови. Анализ таких ферментов наиболее важен для лабораторной диагностики, так как их появление в крови не только указывает на наличие патологического процесса, но и дает возможность определять орган, поврежденный деструкцией. Например, появление в крови большого количества  $\alpha$ -амилазы или липазы свидетельствует о наличии острого панкреатита, а лактатдегидрогеназы – инфаркта миокарда, увеличение в сыворотке крови активности кислой фосфатазы - о наличие рака предстательной железы, а повышенное содержание церулоплазмينا связано с наследственной патологией – гепатолентикулярной дегенерацией.

Специфичность ферментативных тестов существенно повысилась с введением в клиническую практику методов определения изоферментов, различающихся преимущественно разной электрофоретической активностью. Еще одним методом анализа изоферментов может служить использование специфических к изоферменту антител. Этот метод обладает высокой чувствительностью.

## *3. Использование ферментов в качестве аналитических реактивов*

Для определения ряда веществ в диагностической практике, а также в производстве лекарств и методах их стандартизации, ферменты используют в качестве специфических реактивов.

Так, глюкозооксидазу применяют для количественного определения глюкозы в моче и крови. Фермент уреазу используют для определения содержания количества мочевины в крови и моче. Другие ферменты и их смеси используют в клинко-диагностических лабораториях для измерения в крови концентрации холестерина, жира, активных форм кислорода и других веществ.

К ферментам, которые используют в качестве аналитических реагентов, предъявляются особые требования. Во-первых, они

должны характеризоваться высокой степенью «ферментативной чистоты», т.е. не должны содержать примесей других ферментов. Во-вторых, аналитические ферменты должны обладать высокой субстратной специфичностью к тем веществам, количество которых требуется определить. Именно поэтому, энзиматические методы характеризуются высокой точностью, чувствительностью и специфичностью, а время их выполнения занимает всего несколько минут при исследовании минимального объема (10 мкл) плазмы крови или другого материала.

Эффективность ферментативного катализа удалось увеличить в связи с созданием иммобилизованных ферментов. В качестве носителей ферментов используют различные вещества: природные полимеры (целлюлоза, декстран, агароза, альгиновые кислоты и их соли, хитин); синтетические полимеры (стирол, полиакриламидный гель, полиуретан и др.); из органических низкомолекулярных носителей используют природные липиды, либо их синтетические аналоги; белки используют ограничено по причине их иммуногенности.

Иммобилизованные ферменты как аналитические реагенты имеют ряд преимуществ, в сравнении с нативными ферментами. Основными из них являются:

- значительное увеличение стабильности ферментов;
- возможность остановки реакции в любой момент времени;
- многократное использование биокатализатора;
- получение продукта реакции, не загрязненного ферментом;
- проведение непрерывного процесса, например, в проточных колонках;
- целенаправленное изменение свойств фермента для оптимизации каталитического процесса.

Достижения современной биохимии активно используются в фармации при решении таких вопросов в технологии лекарств как биологическое обоснование эффективности различных лекарственных форм; таких вопросов фармацевтической химии как разработка биохимических методов стандартизации и контроля качества лекарств, анализа производства лекарственных веществ.

В качестве аналитических реагентов в фармацевтической промышленности часто применяют иммобилизованные ферменты, которые как ведущие рабочие компоненты входят в автоматические проточные анализаторы либо специальные ферментативные электроды, используемые для анализа лекарственных веществ в



процессе их производства. Так, например, с помощью таких систем налажено автоматическое определение этанола, мочевины, глюкозы, пенициллина и других веществ.

Иммобилизованные ферменты все более широко применяются в фармацевтической промышленности для синтеза лекарственных веществ, поскольку позволяют весьма эффективно, специфично и без побочных продуктов осуществить синтез. В частности, для получения полусинтетических пенициллинов используют иммобилизованную пенициллиназу, для получения стероидных гормонов кортизола, преднизолона – иммобилизованные 11- $\beta$ -стероидгидроксилазу и стероиддегидрогеназу.

### **ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ПО РАЗДЕЛУ «ФЕРМЕНТЫ»**

1. ПО ХИМИЧЕСКОЙ ПРИРОДЕ ВСЕ ФЕРМЕНТЫ ЯВЛЯЮТСЯ:
  - 1) пептидами
  - 2) аминокислотами
  - 3) липидами
  - 4) белками?
2. АБСОЛЮТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ К СУБСТРАТУ ОБЛАДАЕТ ФЕРМЕНТ:
  - 1) химотрипсин
  - 2) пепсин
  - 3) уреаза
  - 4) липаза
3. ПЕПСИН НАИБОЛЕЕ АКТИВЕН ПРИ ОПТИМАЛЬНОМ ЗНАЧЕНИИ PH СРЕДЫ:
  - 1) 1,5-2,5
  - 2) 4-5
  - 3) 6-7
  - 4) 8-9
  - 5) 10-11
4. КАКОЙ ОПТИМУМ PH ИМЕЕТ ФЕРМЕНТ АРГИНАЗА:
  - 1) 1,5-2,5
  - 2) 4 -5
  - 3) 6-7
  - 4) 8-9
  - 5) 10-11
5. ФЕРМЕНТ АМИЛАЗА ИМЕЕТ ОПТИМУМ PH:
  - 1) 1,5-2

- 2) 7-7,5
  - 3) 7,5– 8
  - 4) 3,5-4
  - 5) 4,5-5
6. БОЛЬШИНСТВО ФЕРМЕНТОВ ПРОЯВЛЯЮТ МАКСИМАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ПРИ ЗНАЧЕНИИ PH:
- 1) кислом, pH 1,5-2
  - 2) щелочном, pH 8-9
  - 3) близком к нейтральному, при pH 7
7. ФЕРМЕНТЫ ДЕНАТУРИРУЮТ ПРИ ТЕМПЕРАТУРЕ:
- 1) 0°C
  - 2) 80-100°C
  - 3) 20-30°C
  - 4) 30-40°C?
8. ДЛЯ БОЛЬШИНСТВА ФЕРМЕНТОВ ОПТИМАЛЬНОЙ ЯВЛЯЕТСЯ ТЕМПЕРАТУРА:
- 1) 50-60°C
  - 2) 15-20°C
  - 3) 35-40°C
9. ТИАМИНДИФОСФАТ (ТДФ) ЯВЛЯЕТСЯ КОФЕРМЕНТОМ ДЛЯ ФЕРМЕНТОВ КЛАССА:
- 1) трансфераз
  - 2) оксидоредуктаз
  - 3) гидролаз
  - 4) лиаз
  - 5) лигаз?
10. ТЕТРАГИДРОФОЛИЕВАЯ КИСЛОТА (ТГФК) ПРИНИМАЕТ УЧАСТИЕ В АКТИВАЦИИ И ПЕРЕНОСЕ ГРУПП:
- 1) метильных
  - 2) ацетильных
  - 3) одноуглеродных
  - 4) CO<sub>2</sub>
  - 5) фосфатных
11. ВИТАМИН B<sub>6</sub> ОБРАЗУЕТ КОФЕРМЕНТЫ:
- 1) никотинамидные
  - 2) пиридоксальные
  - 3) флавиновые
  - 4) кофермент КоА
  - 5) кобамидные

12. ГЛУТАТИОН УЧАСТВУЕТ В КАТАЛИЗЕ РЕАКЦИЙ:
- 1) перенос метильных групп
  - 2) окисление  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты
  - 3) обратимое превращение дисульфидных групп в сульфгидрильные
  - 4) перенос фосфатных групп
13. БИОТИН ПРИНИМАЕТ УЧАСТИЕ В АКТИВАЦИИ И ПЕРЕНОСЕ ГРУППЫ:
- 1) ацетильной
  - 2) метильной
  - 3)  $\text{CO}_2$
  - 4) фосфатной
14. НИКОТИНОВУЮ КИСЛОТУ СОДЕРЖАТ КОФЕРМЕНТЫ:
- 1) тиаминдифосфат
  - 2) флавинадениндинуклеотид
  - 3) никотинамидадениндинуклеотид
  - 4) пиридоксальфосфат
15. АКТИВНУЮ ФУНКЦИЮ В КОФЕРМЕНТЕ КОА ВЫПОЛНЯЕТ:
- 1) аденозин-3'-фосфат
  - 2) пантотеновая кислота
  - 3)  $\beta$ -аланин
16. В ПЕРЕНОСЕ АМИНОГРУППЫ УЧАСТВУЕТ КОФЕРМЕНТ:
- 1) тиаминдифосфат
  - 2) ФМН
  - 3) пиридоксальфосфат
  - 4) биотин
  - 5) кофермент А
17. В СОСТАВ ФЕРМЕНТОВ ДЕГИДРОГЕНАЗ ВХОДИТ КОФЕРМЕНТ:
- 1) пиридоксальфосфат
  - 2) биотин
  - 3) НАД
  - 4) ТГФК
  - 5) кофермент А
18. ФЕРМЕНТЫ КИНАЗЫ КАТАЛИЗИРУЮТ ПРЕВРАЩЕНИЯ:
- 1) перенос групп внутри молекулы
  - 2) образование С-О связи
  - 3) разрыв С-С связи
  - 4) перенос фосфатной группы от донорной молекулы к акцепторной

5) присоединение воды

19. В ОСНОВЕ ЭНЗИМОДИАГНОСТИКИ ЛЕЖАТ ОСОБЕННОСТИ ФЕРМЕНТОВ:

- 1) высокая стабильность ферментов
- 2) низкая активность или полное их отсутствие в сыворотки крови в норме
- 3) органоспецифичность
- 4) их выход в кровь при повреждении органов

20. ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ (ПЕПСИН, ТРИПСИН) ИСПОЛЬЗУЮТСЯ В МЕДИЦИНЕ ДЛЯ:

- 1) для очистки ран и участков омертвевшей ткани
- 2) в лечении злокачественных новообразований
- 3) применение при нарушении процесса переваривания, в случае их недостаточности
- 4) в аппаратах «искусственная почка» для специфического разрушения некоторых метаболитов

21. ПРЕИМУЩЕСТВО МИКРОКАПСУЛИРОВАННЫХ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ (УРЕАЗЫ, СТРЕПТОКИНАЗЫ И ДР.), Т.Е. СВЯЗАННЫХ С СИНТЕТИЧЕСКИМИ ПОЛИМЕРАМИ ЗАКЛЮЧАЕТСЯ:

- 1) предотвращается выход ферментов из капсулы
- 2) повышается их стабильность
- 3) ослабляются антигенные свойства ферментов

## РАЗДЕЛ 4. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

### ТЕМА 4.1. СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

#### *Актуальность*

Нуклеиновые кислоты представляют собой высокомолекулярные гетерополимеры, структурными звеньями которых являются нуклеотиды. Нуклеотиды - сложные органические молекулы, состоящие из азотистых оснований, остатка пентозы (рибозы или дезоксирибозы) и фосфорной кислоты. В зависимости от типа пентозы нуклеиновые кислоты подразделяются на дезоксирибонуклеиновые (ДНК) и рибонуклеиновые (РНК).

Нуклеиновые кислоты являются многоосновными кислотами, которые при мягком гидролизе щелочами распадаются на мононуклеотиды. Мононуклеотиды при нагревании до 145<sup>0</sup>С с водным аммиаком теряют остаток фосфорной кислоты с образованием нуклеозидов. Нуклеозиды в условиях кислотного гидролиза распадаются на азотистые основания и сахара. Азотистые основания, входящие в состав нуклеиновых кислот, являются производными ароматических гетероциклических соединений – пурина и пиримидина. Среди пуриновых азотистых оснований в гидролизатах обоих классов нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) преимущественно встречаются аденин и гуанин. Среди пиримидиновых оснований основное значение имеют цитозин, урацил (входит в состав РНК) и тимин (входит в состав ДНК). Кроме перечисленных оснований, в нуклеиновых кислотах в небольших количествах встречаются минорные основания. Перечисленные пуриновые и пиримидиновые основания содержат сопряженную систему кратных связей и заместители (группы –ОН и –NH<sub>2</sub>). Указанные структурные особенности обуславливают способность пуриновых и пиримидиновых оснований к различным типам таутомерных превращений. Рентгеноструктурный анализ трехмерной структуры различных пуриновых и пиримидиновых оснований показал, что молекулы пиримидинов имеют абсолютно плоское строение, а молекулы пуринов – почти плоское.

Азотистые основания поглощают свет в ультрафиолетовой области спектра с максимумом около 260 нм. Поглощение в ультрафиолетовой области используется для количественного определения нуклеиновых кислот.

### *Цель*

Знакомство с методами количественного определения нуклеиновых кислот, применяемых в экспериментальной и клинической биохимии, а также для анализа лекарственных средств нуклеотидной природы в контрольно-аналитических лабораториях.

### *Вопросы для самоподготовки*

1. Назовите понятия: нуклеиновая кислота, нуклеотид, нуклеозид.
2. Чем обусловлено разнообразие нуклеотидов в составе нуклеиновых кислот?
3. Назовите особенности химического состава нуклеотидов ДНК и РНК.
4. Охарактеризуйте первичную структуру нуклеиновых кислот, связи ее образующие.
5. Назовите особенности вторичной структуры ДНК, тип стабилизирующей связи, комплементарность оснований.
6. Укажите особенности третичной структуры ДНК, структурную организацию ДНК в хроматине ядра клеток.
7. Охарактеризуйте вторичную и третичную структуры РНК, ее функциональные виды (м-РНК, т-РНК, р-РНК).
8. Назовите физико-химические свойства нуклеиновых кислот.

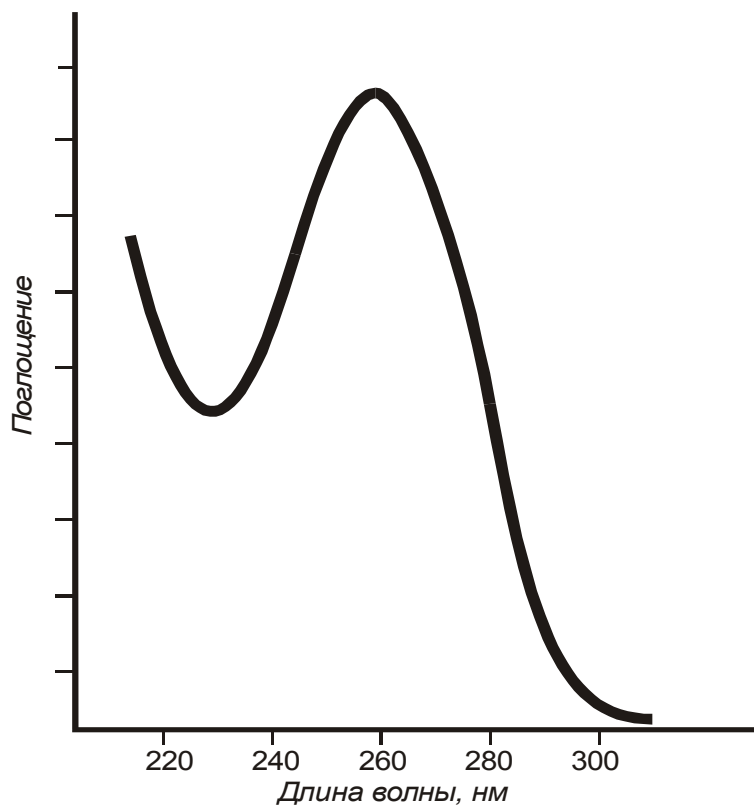
### Лабораторная работа 1

#### **Спектрофотометрический метод определения концентрации нуклеиновых кислот и чистоты репарата ДНК (по А.С. Спирину)**

### *Принцип*

Для количественного определения нуклеиновых кислот используют методы, основанные на регистрации их светопоглощения или на специфических реакциях на отдельные компоненты этих соединений.

Нуклеиновые кислоты имеют максимум поглощения света при 260 нм, который обусловлен присутствием в них азотистых оснований, содержащих сопряженные двойные связи. Белки в этой области спектра характеризуются гораздо более слабым поглощением (не более 1-2 %). Все основания полинуклеотидов обладают тем же максимумом абсорбции, за исключением цитозина, максимум поглощения которого лежит в области 270 нм.



Кривая поглощения в ультрафиолете раствора натриевой соли дрожжевой РНК с максимумом поглощения при 260 нм и минимумом при 230 нм

Поэтому по интенсивности светопоглощения азотистых оснований нуклеотидов можно определять содержание нуклеиновых кислот в растворах или экстрактах из биологического материала.

В тоже время светопоглощение нативной молекулы ДНК при 260 нм на 40-50 % ниже, чем абсорбция составляющих ее свободных нуклеотидов. Этот, так называемый, « гиперхромный эффект» связан с двухспиральной структурой ДНК и обусловлен упорядоченным параллельным расположением комплементарных азотистых оснований нуклеотидов в цепи ДНК, связанных водородными связями. При денатурации ДНК водородные связи между комплементарными азотистыми основаниями разрушаются, что приводит к увеличению поглощения в ультрафиолетовой области спектра.

Учитывая эти особенности нуклеиновых кислот, А.С.Спирин предложил проводить измерение светопоглощения кислотного гидролизата ДНК при двух длинах волн – 260 нм и 290 нм, поскольку при этих условиях на определение концентрации нуклеиновых кислот практически не влияют различия в их нуклеотидном составе.

Раствор, содержащий 1 мкг ДНК/мл, характеризуется при 260 нм оптической плотностью (E) равной 0,02 оптической единицы [Досон Р., Эллиот Д., Элиот У., Джонс К. Справочник биохимика. – М.: Мир, 1991. -544с.]

Тогда, формула для расчета концентрации ДНК принимает вид:

$$(1) [C_{\text{ДНК}}, \text{мкг/мл}] = (E_{260} - E_{290}) \times 0,02$$

О чистоте препарата нуклеиновой кислоты судят по соотношению оптических плотностей ее раствора при длинах волн, характеризующих пик поглощения азотистых оснований входящих в ее состав.

Препарат считается чистым и не содержит примесей ненуклеотидного характера (например, белков, которые благодаря наличию аминокислот с ароматическими радикалами интенсивно поглощают при 290 нм), если выполняются следующие условия:

Отношение поглощения

$$(2) E_{260}/E_{270} < 1,2$$

$$E_{260}/E_{290} > 2,0$$

### *Реактивы*

Стандартные растворы ДНК (чистый и содержащий примеси белка)

1 н раствор  $\text{HClO}_4$  (хлорная кислота, имеет низкую поглощающую способность в ультрафиолетовой области спектра )

### *Проведение анализа*

Пробирка N 1 – содержит раствор чистой нативной ДНК (стандартный раствор разбавленный в два раза).

Пробирка N 2 – содержит раствор чистой гидролизованной в  $\text{HClO}_4$  ДНК ( для этого в пробирке к 1,5 мл раствора ДНК добавляют 1,5 1н раствора  $\text{HClO}_4$  и проводят гидролиз в кипящей водяной бане в течение 20 мин.)

Пробирка N 3 – содержит раствор ДНК гидролизованной в  $\text{HClO}_4$  также как в пробирке N 2 с примесью белка.

Измеряют оптическую плотность растворов, содержащихся в пробирках N 1, 2 и 3 при 260 нм, 270 нм и 290 нм против 0,5 н раствора  $\text{HClO}_4$ .

Результаты заносят в таблицу.



Номер пробирки	Содержимое	E <sub>260</sub>	E <sub>270</sub>	E <sub>290</sub>	E <sub>260</sub> / E <sub>270</sub>	E <sub>260</sub> / E <sub>290</sub>
1	Раствор чистой нативной ДНК		–	–	–	–
2	Раствор чистой гидролизованной ДНК					
3	Раствор гидролизованной ДНК с примесью белка					

На основании полученных результатов:

1. Обосновать вывод о наличии гиперхромного эффекта в гидролизованных растворах ДНК (сравнить поглощение при 260 нм в пробирках N 1 и 2),
2. Сделать обоснованный вывод о чистоте препаратов ДНК в пробирках N 2 и 3,
3. Рассчитать концентрацию ДНК в пробирке N 2, используя формулу:

$$[C_{\text{ДНК}}, \text{мкг/мл}] = (E_{260} - E_{290}) \times 0,02$$

#### *Практическое значение*

Количественный метод определения нуклеиновых кислот применяется в экспериментальной и клинической биохимии, а также для количественного анализа лекарственных средств нуклеотидной или нуклеозидной природы в контрольно-аналитических лабораториях.

### **ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ПО РАЗДЕЛУ «НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ»**

1. ПРИ ПОЛНОМ КИСЛОТНОМ ГИДРОЛИЗЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ОБРАЗУЮТСЯ:
  - 1) пуриновые основания
  - 2) аденозинтрифосфорная кислота
  - 3) пентозы
  - 4) фосфорная кислота
  - 5) аденин
2. В СОСТАВ НУКЛЕОТИДОВ РНК ВХОДЯТ АЗОТИСТЫЕ ОСНОВАНИЯ:
  - 1) пиримидин
  - 2) аденин

- 3) тимин
  - 4) цитозин
  - 5) урацил
3. В СОСТАВ НУКЛЕОТИДОВ ДНК ВХОДЯТ АЗОТИСТЫЕ ОСНОВАНИЯ:
- 1) пурин
  - 2) гуанин
  - 3) аденин
  - 4) тимин
  - 5) цитозин
4. В СОСТАВ НУКЛЕОТИДОВ ДНК ВХОДИТ УГЛЕВОД:
- 1)  $\beta$ -D-глюкопираноза
  - 2)  $\beta$ -D-фруктофураноза
  - 3)  $\beta$ -D-рибофураноза
  - 4)  $\beta$ -D-дезоксирибофураноза
  - 5) D-арабиноза
5. ИЗ ПЕРЕЧИСЛЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ НУКЛЕОЗИДАМИ ЯВЛЯЮТСЯ:
- 1) аденозин
  - 2) дезокситимидин
  - 3) аденозинмонофосфат
  - 4) циклическая адениловая кислота
  - 5) цитидин
6. НУКЛЕОТИДАМИ ЯВЛЯЮТСЯ:
- 1) дезоксигуанин
  - 2) уридин-5'-фосфорная кислота
  - 3) дезоксицитидин-5'-фосфорная кислота
  - 4) уридин
  - 5) адениловая кислота
7. ИЗ ПЕРЕЧИСЛЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ РИБОНУКЛЕОЗИДТРИФОСФАТАМИ ЯВЛЯЮТСЯ:
- 1) АДФ
  - 2) ГТФ
  - 3) ЦТФ
  - 4) АТФ
  - 5) УМФ
8. ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОЗИДДИФОСФАТАМИ ЯВЛЯЮТСЯ:
- 1) дГДФ
  - 2) дАТФ
  - 3) УДФ

- 4) дЦТФ
  - 5) дУДФ
9. АБСОРБЦИОННЫЙ МАКСИМУМ В ОБЛАСТИ 240-270 НМ  
НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ ИМЕЮТ ЗА СЧЕТ:
- 1) водородной связи
  - 2) рибозы
  - 3) фосфорной кислоты
  - 4) гетероциклических соединений
  - 5) фосфодиэфирной связи
10. С КАКИМИ СОЕДИНЕНИЯМИ ЦИТОЗИН СОЧЕТАЕТСЯ  
ВОДОРОДНЫМИ СВЯЗЯМИ, ОБРАЗУЯ КОМПЛЕМЕНТАРНУЮ  
ПАРУ С АЗОТИСТЫМ ОСНОВАНИЕМ:
- 1) аденин
  - 2) ксантин
  - 3) гуанин
  - 4) гипоксантин
11. ЛИНЕЙНУЮ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ НУКЛЕОТИДОВ В  
ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ  
ФОРМИРУЮТ СВЯЗИ:
- 1) ионные
  - 2) 3',5'-фосфодиэфирные
  - 3) профосфатные
  - 4) водородные
  - 5) координационные
12. ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ  
НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ВОДОРОДНЫЕ СВЯЗИ ВОЗНИКАЮТ  
МЕЖДУ ПАРАМИ ОСНОВАНИЙ:
- 1) Г – А
  - 2) А – Т
  - 3) А – У
  - 4) Г – Ц
  - 5) Г – Т
13. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДНК С БЕЛКОМ ВЕДЕТ К ОБРАЗОВАНИЮ:
- 1) рибосомы
  - 2) миозина
  - 3) вируса
  - 4) хроматина в ядре
  - 5) ДНП в цитоплазме

14. ФИЗИЧЕСКИМ ИЗМЕНЕНИЕМ, ВОЗНИКАЮЩИМ ПРИ ДЕНАТУРАЦИИ ДНК, ЯВЛЯЕТСЯ:

- 1) изменение спектра поглощения
- 2) уменьшение вязкости
- 3) гиперхромный эффект
- 4) увеличение плавучей плотности
- 5) увеличение отрицательного угла вращения плоскости поляризации

## РАЗДЕЛ 5. ВИДЫ ПЕРЕНОСА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ

### ТЕМА 5.1. МАТРИЧНЫЕ БИОСИНТЕЗЫ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И БЕЛКА

#### *Актуальность*

Белки, как и другие компоненты клетки, находятся в состоянии динамического равновесия, то есть непрерывно обновляются. Знание механизмов матричных биосинтезов и принципов регуляции этих процессов необходимо для понимания молекулярных основ возникновения наследственных заболеваний, а также рационального использования химиотерапевтических средств. Прерывание синтеза белка или извращение возможно на всех трех уровнях: репликации, транскрипции и трансляции. Химические вещества, называемые мутагенами, воздействуют на процессы репликации и на структуру транскриптона и извращают информацию о синтезе полипептидов. Такие мутагены окружающей среды, как бензоперен и линдан, подавляют синтез ДНК и таким образом прерывают белок – синтетические процессы. Выявлено влияние токсинов на процессы транскрипции. В этом отношении показательно влияние химических веществ, имитирующих действие эстрогенов, так называемых ксеноэстрогенов. К ним относятся, например, генистан или госсипол, способные взаимодействовать с эстрогеновыми рецепторами и изменять скорость транскрипции.

К лекарственным веществам, эффективно влияющим на синтез белка, относятся антибиотики. Как правило, они ингибируют процессы транскрипции и трансляции. Так, противоопухолевые антибиотики – актиномицин D, рубомицин C, оливомицин, митомицин C – блокируют транскриптон или ингибируют РНК-полимеразу. Большинство антибиотиков противобактериального действия ингибируют процессы трансляции.

Такие антибиотики, как норвалин и индолмицин, препятствуют образованию аминоацил – т РНК; стрептомицин, неомицин, конвалин ингибируют инициацию трансляции; тетрациклин и стрептомицин тормозят элонгацию, препятствуя связыванию аминоацил-тРНК с А-центром рибосомы. Пептидилтрансферазная реакция блокируется пурамицином и хлорамфениколом, а транслокация – эритромицином и виомицином.

Антибиотики, ингибирующие синтез белка во всех клетках, весьма токсичны, и многие из них не нашли применения в медицинской практике.

### *Цель*

Освоение основных методов количественного определения белка.

### *Вопросы для самоподготовки:*

1. Назовите роль нуклеиновых кислот в переносе генетической информации.
2. Какой механизм называется репликацией? Назовите биологическое значение. Повреждение и репарация ДНК.
3. Укажите строение транскрипта ДНК, экзоны и интроны.
4. Какой механизм называется транскрипцией? Назовите его биологическую роль и посттранскрипционную модификацию пре-м-РНК.
5. Назовите этапы биосинтеза белка (трансляция).
6. Назовите основные компоненты белоксинтезирующей системы.
7. Назовите роль м-РНК в биосинтезе белков.
8. Назовите роль генетического кода, укажите его свойства.
9. Укажите строение и адапторную роль транспортной РНК в биосинтезе белков. Синтез аминоксил-тРНК, специфичность аминоксил-тРНК-синтетазы.
10. Укажите строение и функциональный цикл рибосом. Последовательность стадий синтеза полипептидной цепи.
11. Охарактеризуйте посттрансляционную модификацию белков. Укажите значение шаперонов.
12. Назовите регуляцию биосинтеза белка путем индукции и репрессии (схема Жакоба и Моно).
13. Назовите лекарственные препараты – активаторы и ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот и белка.
14. Укажите лекарственные вещества – мутагены. Назовите примеры молекулярной патологии.
15. Назовите основные стадии методов генной инженерии, их применение в медицине и фармации.

Лабораторная работа 1  
**Количественное определение белка  
 микробиуретовым методом Ицаки-Гилла**

*Принцип*

Белки и пептиды в щелочной среде образуют с медью комплексное соединение (биуретовая реакция). Интенсивность развивающегося фиолетового окрашивания пропорциональна содержанию белка.

*Реактивы*

1) Биуретовый реактив: смесь сульфата меди (II) и натрия гидроксида; 2) 0,9% раствор NaCl, 3) Эталонный раствор альбумина, 70 г/л.

*Проведение анализа*

	<b>ОПЫТ, мл</b>	<b>СТАНДАРТ, мл</b>
Сыворотка	0,04	–
Раствор альбумина	–	0,04
Биуретовый реактив	3,0	3,0
Выдерживают 10 мин. Измеряют оптическую плотность проб против воды на ФЭКе при длине волны 540-560 нм.		

*Расчет*

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

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

*Оформление работы*

Отмечают принцип метода, регистрируют результаты анализа и делают вывод по возможным отклонениям содержания белка от нормальных величин.

Лабораторная работа 2  
**Количественное определение белка  
 рефрактометрическим методом**

*Принцип*

При переходе из одной прозрачной среды (стекло) в другую (сыворотка крови) под наклоном к поверхности раздела двух фаз луч света преломляется. При этом отношение синуса угла падения к синусу угла преломления называется коэффициентом преломления

(рефракции). В сыворотке крови величина рефракции зависит от количества и состава белков.

*Материал исследования:* сыворотка крови.

*Оборудование:* рефрактометр.

*Проведение анализа*

Проверяют нулевую точку прибора путем определения показателя преломления дистиллированной воды. Для этого на чистую поверхность измерительной призмы капают 2-3 капли воды и опускают осветительную призму. Наводят окуляр на резкость. Поворотом рефрактометра к свету добиваются наилучшей освещенности шкалы и штриха. Вращением маховичка "И" границу светотени вводят в поле зрения окуляра. Вращают маховичок компенсатора "К" до исчезновения окраски границы светотеней. Наблюдая в окуляр, маховичком "И" наводят границу светотени точно на линию штриха. Снимают отсчет по шкале. Показатель преломления дистиллированной воды равен 1,333.

Измерение показателя преломления сыворотки крови проводят аналогичным образом.

После проведения измерений поверхности призм очистить мягкой салфеткой.

*Расчет*

Зная показатель преломления, расчет проводят по таблице:

<b>Показатель преломления</b>	<b>Концентрация белка в сыворотке крови, г/л</b>
1,34500	52,5
1,34557	54,7
1,34575	56,8
1,34612	59,0
1,34650	61,2
1,34687	63,4
1,34724	65,5
1,34761	67,7
1,34798	69,8
1,34836	72,0
1,34870	74,2
1,34910	76,3
1,34947	78,5
1,34984	80,6
1,35021	82,8



*Нормальные величины*

Сыворотка крови

дети

новорожденные 52-91 г/л

до 3 лет 54-85 г/л

взрослые 65-85 г/л

Моча 10-140 мг/л

*Клинико-диагностическое значение определения общего белка:*

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

**А. в сыворотке**

*Истинная (абсолютная) гипопроотеинемия* связана: а) с недостаточным потреблением белка с пищей – заболевания желудочно-кишечного тракта, сужение пищевода при опухолях, недоедание, голодание; б) со снижением синтеза белка – несбалансированный аминокислотный состав пищи, хронические паренхиматозные гепатиты, интоксикации, злокачественные новообразования, лечение кортикостероидами; в) с усиленным распадом – кахексия, тяжелые инфекции, длительные воспалительные процессы, лихорадочные состояния, тиреотоксикозы; г) с потерей белка – нарушения проницаемости капиллярных стенок, кровоизлияния, ожоги, острые и хронические кровотечения.

*Относительная гипопроотеинемия* связана с нарушением водного баланса – гипергидратация. Гипопроотеинемия чаще всего связана с уменьшением фракции альбуминов крови.

*Истинная гиперпротеинемия* встречается при острых инфекциях (увеличение синтеза белков острой фазы), при хронических (за счет  $\gamma$ -глобулинемии), при миеломной болезни, лимфогрануломатозе, саркоидозе.

*Относительная гиперпротеинемия* вызывается потерями внутрисосудистой жидкости в результате профузных поносов (например, холере), усиленном потоотделении, неукротимой рвоте, несахарном диабете, тяжелых и обширных ожогах, генерализованных перитонитах.

**Б. в моче**

Белок появляется при заболеваниях почек с нарушением почечного фильтра.

*Оформление работы*

Отмечают принцип метода, регистрируют результаты анализа и делают вывод по возможным причинам отклонения содержания белка от нормы.

## **ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ДНК-ТЕХНОЛОГИЙ В ФАРМАЦИИ И МЕДИЦИНЕ**

Развитие прикладных областей молекулярной биологии, генетики, биохимии существенно изменило способы получения целого ряда лекарственных препаратов, обеспечило бурное развитие фармацевтической биотехнологии.

В фармацевтической биотехнологии достигнуты ощутимые успехи в области микробного синтеза лекарственных веществ, получения и применения ферментов для медицинских целей и в фармацевтической промышленности, в области генно-инженерной биотехнологии лекарственных средств.

В основе методологии генной инженерии лежит разработка и совершенствование методов анализа и манипулирования ДНК. Среди основных стадий методов генной инженерии выделяют:

- 1) получение интересующего гена, т.е. фрагмента ДНК;
- 2) соединение этого гена с так называемой векторной молекулой, способной доставить ген в клетку хозяина и тем обеспечить репликацию чужеродного гена;
- 3) введение полученной гибридной ДНК в клетку реципиента;
- 4) отбор клеток, где размножается (клонировается) введенный чужеродный ген.

*Получение гена* (или его фрагмента) осуществляют путем химического синтеза, позволяющего в автоматизированном синтезаторе получать олигонуклеотиды с заданной последовательностью и длиной до 100 мономеров; либо ферментативным способом используя обратную транскриптазу, катализирующую синтез ДНК на матрице мРНК или рестриктазу-фермент группы эндонуклеаз.

*Получение гибридной ДНК.* Соединение этого гена с так называемой векторной молекулой, способной доставить ген в клетку хозяина и тем обеспечить репликацию, транскрипцию чужеродного гена, а также трансляцию с образованием нужного продукта. В

качестве вектора применяются бактериофаги и бактериальные плазмиды. Гибридную ДНК получают путем разрезания молекулы вектора специальными ферментами, после чего ген (или его фрагмент) ковалентно соединяют с родственным ему фрагментом ДНК при помощи ДНК-лигазы.

*Перенос гибридной ДНК в клетку реципиента.* После получения гибридной ДНК ее вносят в среду, где находятся клетки-реципиенты. Наиболее частым объектом является кишечная палочка. Для улучшения проникновения гибридной ДНК в клетки их обрабатывают различными способами (например, растворами  $\text{CaCl}_2$ ).

*Отбор клеток, в которых, клонируется введенный чужеродный ген.* Клетки, в которых начинается размножение генов, транскрибирование и транслирование, отбираются. Индикатором функционирования пересаженного гена является соответствующий белок. Значительная часть этих белков выделяется во внеклеточную среду, их легко можно получить, например, осадив клетки центрифугированием.

Генноинженерные методы послужили основой промышленного получения белковых лекарственных препаратов. Подобными методами была осуществлена пересадка многих генов, в том числе инсулина, соматостатина, овальбумина и др. ДНК-технологии легли в основу получения белковых и пептидных лекарственных препаратов, таких как вакцины против возбудителей вирусных инфекций, интерфероны, инсулин, гормон роста, белковые препараты для диагностики СПИДа и др.

*Полимеразная цепная реакция (ПЦР).* Важнейшим достижением молекулярной биологии является метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), который дает возможность избирательно синтезировать *in vitro* (в пробирке) небольшие участки ДНК и получить за 3-4 ч несколько миллионов копий исследуемого фрагмента (амплификация ДНК). Объектами для выделения ДНК могут быть кровь, биоптат ткани, слюна, моча, околоплодные воды, при этом не требуется больших количеств исследуемой ДНК, достаточно даже одной молекулы в одной капле крови или спермы.

Успех в разработке метода в значительной степени обусловлен использованием в качестве фермента термофильной ДНК-полимеразы, выделенной из бактерий, живущих в горячих источниках, и поэтому устойчивой к действию высоких температур.

Реакционная смесь для получения интересующей нас ДНК содержит исследуемую ДНК, субстраты реакции -4дНТФ, 2 праймера, термостабильную, или Taq –полимеразу и буфер, содержащий ионы  $Mg^{2+}$ .

Один цикл полимеризации включает 3 этапа:

- *плавление* - на этой стадии реакционную смесь нагревают до температуры 90-97<sup>0</sup>С. Исследуемая двуцепочечная ДНК денатурирует и переходит в однонитевую форму;
- *гибридизация или отжиг ДНК с праймерами* – в результате снижения температуры до 50-60<sup>0</sup>С происходит комплементарное связывание праймеров с цепями матричной ДНК и образование двухцепочечного участка на каждой из нитей ДНК;
- *элонгация*, удаление нитей ДНК, комплементарных матричной ДНК, катализирует Taq-полимераза в направлении от 5' - к 3'-концу.

Затем снова наступает этап плавления, когда за счет повышения температуры синтез ДНК прекращается, и двунитевой участок между матричными и вновь синтезированными молекулами ДНК денатурирует. Во втором и последующих циклах праймеры гибридизируются с исходной матричной ДНК и с вновь синтезированными молекулами ДНК, количество которых нарастает в геометрической прогрессии. В последнем случае синтез ДНК заканчивается не из-за изменения температурного режима, а по достижении ДНК-полимеразной границы амплифицированного участка, что определяет строго определенный размер продукта с точностью до одного нуклеотида.

Описанную процедуру амплификации ДНК проводят в автоматическом режиме в приборе – циклизаторе, или термоциклере, амплификаторе ДНК. Такой прибор позволяет задавать нужное количество циклов и выбирать оптимальные временные и температурные параметры. За 25-30 циклов число синтезированных копий ДНК достигает нескольких миллионов.

С помощью ПЦР можно получить достаточное количество копий участков ДНК, в которых предполагается присутствие мутаций, полиморфизм сайтов, можно проводить ДНК-диагностику инфицированности пациентов вирусными, бактериальными и грибковыми возбудителями болезней.

**ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ПО РАЗДЕЛУ  
«ВИДЫ ПЕРЕНОСА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ»**

1. тРНК ВЫПОЛНЯЮТ ФУНКЦИЮ:
  - 1) служат адапторами аминокислот к кодонам мРНК
  - 2) осуществляют передачу генетической информации дочерним клеткам
  - 3) являются структурными компонентами рибосом
2. мРНК ВЫПОЛНЯЮТ ФУНКЦИЮ:
  - 1) являются структурными компонентами хроматина
  - 2) служат матрицами для синтеза белка
  - 3) служат матрицами для синтеза РНК
  - 4) являются структурными компонентами рибосом
3. СУБСТРАТАМИ ДЛЯ ПРОЦЕССА РЕПЛИКАЦИИ ЯВЛЯЮТСЯ:
  - 1) дАТФ
  - 2) дАМФ
  - 3) дГТФ
  - 4) ТТФ
  - 5) дЦМФ
4. МАТРИЦЕЙ ДЛЯ ПРОЦЕССА ТРАНСКРИПЦИИ СЛУЖИТ:
  - 1) транскриптон
  - 2) оперон
  - 3) ДНК
  - 4) РНК
5. ИНГИБИТОРАМИ ТРАНСКРИПЦИИ ЯВЛЯЮТСЯ ТАКИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ КАК:
  - 1) рифамицин
  - 2) эритромицин
  - 3) тетрациклины
  - 4) стрептомицин
6. В ПРОЦЕССЕ РЕКОГНИЦИИ УЧАСТВУЮТ СТРУКТУРЫ:
  - 1) мРНК
  - 2) ДНК
  - 3) аминокислоты
  - 4) aa-тРНК-синтетаза
  - 5) белки рибосомальных частиц
7. ИНГИБИТОРАМИ ТРАНСЛЯЦИИ ПО ДЕЙСТВИЮ ЯВЛЯЮТСЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ПРЕПАРАТЫ:
  - 1) рифамицин
  - 2) стрептомицин

- 3) тетрациклины
  - 4) эритромицины
8. В ОБРАЗОВАНИИ 3',5'-ФОСФОДИЭФИРНЫХ СВЯЗЕЙ МЕХАНИЗМА РЕПЛИКАЦИИ УЧАСТВУЕТ ФЕРМЕНТ:
- 1) ДНК-полимераза  $\delta$
  - 2) ДНК-лигаза
  - 3) ДНК-полимераза  $\alpha$
  - 4) ДНК-хеликаза
  - 5) ДНК-полимераза  $\beta$
9. В МЕХАНИЗМЕ РЕПЛИКАЦИИ ФЕРМЕНТ ДНК-ПОЛИМЕРАЗА А СИНТЕЗИРУЕТ ПРАЙМЕР, КОТОРЫЙ ПО СТРУКТУРЕ ЯВЛЯЕТСЯ:
- 1) нуклеотидом
  - 2) олигорибонуклеотидом (примерно 8-10 рибонуклеотидов)
  - 3) фрагментом, комплементарным цепи матричной ДНК
  - 4) дезоксирибонуклеотидом
10. ПРИ ФОРМИРОВАНИИ РЕПЛИКАТИВНОЙ ВИЛКИ РАЗРЫВ 3',5'-ФОСФОДИЭФИРНЫХ СВЯЗЕЙ В ЦЕПИ ДНК ВЫПОЛНЯЕТ ФЕРМЕНТ:
- 1) ДНК-хеликаза
  - 2) ДНК-топоизомераза
  - 3) ДНК-полимераза  $\alpha$

## РАЗДЕЛ 6. ИММУНОБИОХИМИЯ

### ТЕМА 6.1. БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ИММУНИТЕТА

#### *Актуальность*

Иммуноглобулины (антитела) представляют собой белки плазмы крови, которые по своей электрофоретической подвижности относятся к гамма-глобулинам – наименее подвижной в электрическом поле фракции белков сыворотки крови. Антитела (иммуноглобулины) – это специализированные белки с характерными особенностями строения, функций, регуляции биосинтеза. С ними связан иммунитет, т.е. специфическая защита организма от генетически чужеродных молекул и клеток, в том числе от всевозможных инфекционных агентов (бактерий, вирусов, грибов, простейших) – антигенов. Следовательно, антитела – это специализированные белки, вырабатываемые в ответ на введение в организм генетически чужеродных соединений (антигенов) и обладающих способностью связываться с ними, вызывая образование осадка (реакцию преципитации), или склеивание клеток (реакцию агглютинации), или разрушение мембран клеток (реакцию лизиса). Антитела синтезируются в В-лимфоцитах при участии Т-лимфоцитов (точнее: плазмочитами, образуемыми В-лимфоцитами при участии макрофагов и Т-хелперов). Иммуноглобулины и синтезирующие их В-лимфоциты (плазмочиты) составляют только часть иммунной системы организма, обеспечивающей гуморальный иммунитет. Антитела образуются, главным образом, в лимфатических узлах и селезенке и, выделяясь в кровь, составляют фракцию иммуноглобулинов (или гамма-глобулинов) плазмы крови.

#### *Цель*

Знакомство с иммунохимическими методами анализа.

#### *Вопросы для самоподготовки*

1. Назовите строение, классы иммуноглобулинов, их специфические функции в иммунном ответе организма.
2. Назовите принципы клеточного иммунитета.
3. Назовите принципы гуморального иммунитета.
4. Охарактеризуйте реакцию антиген-антитело, понятия преципитация, агглютинация.
5. Назовите роль Т-лимфоцитов в иммунном ответе.
6. Назовите роль В-лимфоцитов в иммунном ответе.

7. Охарактеризуйте клонально-селекционную теорию биосинтеза антител.
8. Назовите неспецифические защитные реакции организма.
9. Назовите роль наследственности и вторичные дефекты иммунной системы.
10. Охарактеризуйте ВИЧ-инфекцию как пример иммунодефицита.

### **ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ИММУНОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ АНАЛИЗА В МЕДИЦИНЕ И ФАРМАЦИИ**

Иммунохимические методы анализа широко вошли в аналитическую практику и используются в различных областях медицины для определения широкого спектра показателей. В настоящее время они нашли применение:

- в эндокринологии для диагностики сахарного диабета, патологии гипофизарно-надпочечниковой и тиреоидной систем, изучения механизмов эндокринно-обменных нарушений;
- в онкологии для ранней диагностики злокачественных опухолей и контроля эффективности лечения;
- в кардиологии для диагностики острого инфаркта миокарда и дифференциации форм сосудистых нарушений;
- в педиатрии для определения причин нарушений развития у детей и подростков;
- в акушерстве и гинекологии для диагностики гинекологических заболеваний и выявления причин бесплодия;
- в аллергологии для определения концентрации иммуноглобулинов и аллергенов;
- в психиатрии для оценки эффективности лечения и т.д.

В основе всех иммунохимических методов анализа лежит реакция специфического связывания между антителами и антигенами. Она может протекать в несколько стадий, если в молекуле антитела более одного центра связывания, что служит причиной многостадийного образования сложных комплексов.

Индикация образовавшегося комплекса антиген-антитело в растворе осуществляется путем введения метки в один из исходных компонентов реакционной системы, которая легко детектируется соответствующими высокочувствительными физико-химическими методами. Наиболее удобными для этой цели являются изотопные, ферментные, флуоресцентные, парамагнитные метки, именно их



использование позволило увеличить чувствительность иммунохимических методов в миллионы раз, а время анализа уменьшить до нескольких часов.

Так как процесс комплексообразования пары антиген-антитело происходит в строго количественном соотношении, то экспериментально устанавливаемая концентрация метки, входящей в состав образующегося иммунохимического комплекса, однозначно связана с исходной концентрацией антигена. Увеличение точности анализа было достигнуто в результате отделения комплексов от свободных компонентов, путем иммобилизации одного из компонентов пары антиген-антитело на твердом носителе.

Использование твердых носителей для сорбционной или ковалентной иммобилизации антител с последующим специфическим связыванием анализируемого соединения на иммуносорбенте и выявлением образовавшихся иммунокомплексов с помощью меченых ферментами компонентов положило начало методам твердофазного иммуноферментного анализа.

Эти методы, наиболее распространенные, используются для определения широкого круга как низкомолекулярных, так и высокомолекулярных соединений – антител, пептидных и стероидных гормонов, фармакологических препаратов, вирусных и бактериальных антигенов, пестицидов и т.д.

Быстрое внедрение иммуноферментного анализа (ИФА) в лабораторную практику, которое наблюдается в последнее десятилетие, связано с усовершенствованием техники такого анализа и обусловлено потребностью в быстрых, чувствительных, специфических, производительных и простых методах. Этот бурный прогресс стал возможен благодаря разработке большого количества ИФА методик определения микотоксинов, гормонов, антибиотиков, сульфаниламидных препаратов, патогенных микроорганизмов, энтеротоксинов и т.д.

Огромное значение также имеет и серийное производство высококачественных компонентов для иммуноферментного анализа – антител и конъюгатов, а также комплектных тест-систем для ИФА.

На сегодняшний день известно много вариантов постановки ИФА. Однако среди различных модификаций ИФА наибольшее распространение получили конкурентный метод, применяемый обычно в анализе гормонов, и метод двойного связывания, обычно используемый в серодиагностике инфекций.

В *методе двойного связывания* первая реакция происходит между определяемым Ig и очищенным антигеном возбудителя, фиксированным к поверхности лунок иммунологического планшета. После завершения первой реакции планшет отмывается. При этом несвязавшиеся компоненты исследуемой пробы удаляются, а на стенках лунок остается комплекс антиген-антитело. Для выявления образовавшихся иммунных комплексов проводят вторую иммунологическую реакцию, в которой в качестве антигена выступает связавшийся специфический Ig, а в качестве антител к нему - конъюгат, представляющий собой Ig (например, кроличий) к соответствующему Ig человека, меченный ферментом (обычно пероксидазой). После завершения второй иммунологической реакции следует отмывка лунок планшета от избытка конъюгата и далее – третий этап – ферментативная реакция, катализируемая ферментной частью молекулы конъюгата. Субстратом данной реакции служит бесцветное вещество – хромоген (орто-фенилендиамин, ОФД или тетраметилбензидин, ТМБ), который в ходе реакции образует окрашенное вещество. Интенсивность окраски в лунке определенным образом зависит от количества содержащихся в пробе Ig. После остановки ферментативной реакции проводят фотометрирование лунок. Далее с учетом значений оптической плотности контрольных проб проводят математическую обработку результатов анализа. В общем случае, чем выше оптическая плотность в данной лунке, тем больше количество специфических антител в соответствующей пробе и, следовательно, выше титр анализируемой сыворотки. При отсутствии в сыворотке исследуемых антител лунки остаются неокрашенными.

В *конкурентном анализе* антитела к определяемому соединению фиксированы к поверхности лунки планшета. В лунку вносится анализируемая проба и конъюгат, конкурирующий за места связывания с фиксированными антителами и имеющий в своем составе ферментативную метку. Анализ проводится в два этапа: иммунологическая реакция и ферментативная реакция. Зависимость между концентрацией анализируемого вещества и оптической плотностью в лунках имеет обратную зависимость.

Методы ИФА, как самостоятельное научное направление, имеющее важное прикладное значение находятся в постоянном развитии. С одной стороны, расширяется число объектов исследования, с другой – углубляются и совершенствуются методы

самого анализа. Это приводит к тому, что упрощается схема анализа, сокращается время его проведения, уменьшается расход реагентов. Идет постоянный поиск все новых и новых ферментов, используемых в качестве маркеров. Все возрастающее влияние на ИФА оказывают химия высокомолекулярных соединений, клеточная и генная инженерия, под влиянием которых меняются технологии получения реагентов для ИФА.

Для ознакомления с методами иммуноферментного анализа, изложены следующие способы определения.

#### *Определение миоглобина крови*

Миоглобин крови определяют с помощью тест-системы иммуноферментного анализа (ИМА). В основе твердофазного иммуноферментного анализа лежит высококонтактное связывание антител к миоглобину с поверхностью полистерола, в результате чего внутренняя поверхность лунок планшета приобретает свойства антительного сорбента, способного извлекать из биологических жидкостей миоглобин. Образовавшийся комплекс «антитело-антиген» выявляется с помощью тех же (по специфичности) антител, конъюгированных с ферментом (пероксидазой из корня хрена). Далее, ферментативная активность определяется по изменению окраски субстратной смеси. Изменение окраски регистрируется на многоканальном микрофотометре при длине волны 492 нм. Расчет концентрации миоглобина (МГ) производится графически по калибровочной кривой; результаты выражаются в нг/мл. Значительное увеличение миоглобина в крови наблюдается при остром инфаркте миокарда. В норме уровень миоглобина составляет 35-50 мкг/л.

#### *Определение фибронектина в крови*

Фибронектин определяют с помощью тест-системы ИФА, в основе которой лежит принцип твердофазного иммуноферментного анализа на поверхности полистероловых планшетов посредством гидрофобных связей к фибронектину на полистероле. Образующийся таким образом специфический антительный сорбент способен извлекать из любых биологических жидкостей фибронектин. Образовавшийся комплекс антиген-антитело выявляют с помощью меченых ферментом (пероксидазой) антител той же специфичности. Затем ферментативную активность определяют по изменению окраски соответствующей данному ферменту субстратной смеси. Для количественного определения

фибронектина используют калибровочную кривую. Результаты исследований регистрируют на многоканальном микрофотометре мультискан фирмы «Титертек» (Великобритания) при длине волны 492 нм. Результаты выражают в мкг/мл.

Фибронектин - холододовой нерастворимый глобулин, поверхностный клеточный белок, способствующий слипанию клеток. Нормальное содержание фибронектина 300 мкг/мл крови. Снижается уровень фибронектина при шоке, травме, синдроме диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови.

#### *Определение антител к миоглобину и инсулину в сыворотке крови*

Исследование антител к миоглобину и инсулину проводят с помощью тест-системы иммуноферментного анализа. Нормальное содержание антител к инсулину составляет  $25-34 \times 10^3$  г/л, а антител к миоглобину 10-15 мкг/мл. Значительное увеличение концентрации антител к инсулину установлено у больных сахарным диабетом, а снижение уровня антител к миоглобину у больных острым инфарктом миокарда.

#### *Определение антител к инсулину в сыворотке крови*

Для определения антител к инсулину используется твердофазный иммуноферментный метод.

Конструирование диагностикума осуществляется по следующей схеме: иммобилизация связывающего агента- инсулина на твердой фазе путем физической сорбции; комплементарное присоединение лиганда - антител к инсулину – из исследуемой жидкости; маркирование образовавшегося комплекса с помощью конъюгата антител козы а к L-цепям иммуноглобулинов человека с пероксидазой; детекция реакции по экстинкции раствора хромогена, изменяющего свою окраску в зависимости от количества кислорода, выделенного из перекиси водорода при разложении ее пероксидазой. Исследование проводят в полистероловых планшетах для иммунологических реакций. При проведении иммуноферментного анализа используют «монопиковый» инсулин свиньи и быка производства завода эндокринных препаратов. В качестве фермента метки для приготовления меченных антител используют высокоочищенную пероксидазу марки А, 945-960 единиц активности. Изменение окраски регистрируют на многоканальном микрофотометре при длине волны 492 нм. Калибровочную кривую зависимости оптической плотности от средней концентрации

антител инсулина в двух лунках строят по полученным значениям оптической плотности, а по оси абсцисс – соответствующим им концентрациям антител к инсулину. Высота и угол наклона полученной калибровочной кривой соответствуют стандартной калибровочной кривой. Результаты выражают в г/л ( $1 \cdot 10^{-3}$  г/л).

### **ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ПО РАЗДЕЛУ «ИММУНОБИОХИМИЯ»**

1. ИММУНОГЛОБУЛИНЫ СИНТЕЗИРУЮТСЯ
  - 1) в В-лимфоцитах
  - 2) в Т-лимфоцитах
2. ПО ХИМИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЕ ИММУНОГЛОБУЛИНЫ ЯВЛЯЮТСЯ:
  - 1) простыми белками
  - 2) гликопротеинами
  - 3) полипептидами
3. ИММУНОГЛОБУЛИНЫ СПЕЦИФИЧЕСКИ ВЗАИМОДЕЙСТВУЮТ:
  - 1) с антителами
  - 2) с антигенами
4. ОДИН МОНОМЕР В СВОЕМ СОСТАВЕ СОДЕРЖИТ ИММУНОГЛОБУЛИН:
  - 1) А
  - 2) G
  - 3) D
  - 4) E
  - 5) M
5. ИММУНОГЛОБУЛИНЫ РАЗНЫХ КЛАССОВ ОТЛИЧАЮТСЯ МЕЖДУ СОБОЙ:
  - 1) функцией
  - 2) молекулярной массой
  - 3) первичной структурой тяжелых цепей
  - 4) первичной структурой легких цепей
6. АКТИВНЫЙ ЦЕНТР АНТИТЕЛА ФОРМИРУЕТСЯ ЗА СЧЕТ:
  - 1) только тяжелой цепи
  - 2) взаимодействия переменных областей тяжелой и легкой цепей
  - 3) легкой цепи
  - 4) связывания антигена посредством образования множества нековалентных связей

7. КЛАСС ИММУНОГЛОБУЛИНА ОПРЕДЕЛЯЕТСЯ:
- 1) типом легкой цепи
  - 2) типом тяжелой цепи
8. ОСНОВНЫМИ ЗАЩИТНЫМИ БЕЛКАМИ ПЛАЗМЫ КРОВИ ЯВЛЯЮТСЯ ИММУНОГЛОБУЛИНЫ КЛАССА:
- 1) E
  - 2) M
  - 3) A
  - 4) G
9. В СЕКРЕТАХ МОЛОКА, СЛЮНЕ, СЕКРЕТАХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ И КИШЕЧНОГО ТРАКТА ПРИСУТСТВУЮТ АНТИТЕЛА КЛАССА:
- 1) G
  - 2) E
  - 3) A
  - 4) Д
  - 5) M

## РАЗДЕЛ 7. БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ

### ТЕМА 7.1. СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

#### *Актуальность*

Биологические мембраны играют важную роль, как в структурной организации, так и в функционировании клеток и клеточных органелл. Основные принципы структурной организации всех мембран одинаковы. Биологические мембраны представляют собой «ансамбли» липидных и белковых молекул, удерживаемых вместе с помощью нековалентных связей. Основу мембран составляет двойной липидный слой, в формировании которого, участвуют фосфолипиды и гликолипиды. Липидный бислой образован двумя рядами липидов, гидрофобные радикалы которых спрятаны внутрь, а гидрофильные наружу. Однако разные мембраны, так, например, плазматическая мембрана, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, митохондриальная и ядерная мембраны имеют существенные структурные особенности. От разнообразия мембранных структур клетки зависит разнообразие выполняемых функций.

Сложная структура мембран позволяет им обеспечивать многие процессы жизнедеятельности, поддерживать гомеостаз клетки и в то же время быстро реагировать на изменения внешней среды.

Особенности строения биологических мембран имеют большое значение для транспорта лекарственных веществ через мембраны. Установлено, что с помощью простой диффузии через мембраны легко проникают только жирорастворимые, неионизированные молекулы. Через мембрану путем простой диффузии проникают также малые биомолекулы: вода,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$ , некоторые ионы. Нерастворимые в липидах полярные молекулы лекарственных веществ могут проникать внутрь клетки только в случае, если они смогут пройти через узкие поры клеточной мембраны путем фильтрации или путем активного транспорта (с помощью транспортных ферментных систем). Большинство лекарственных веществ, представляют собой слабые кислоты (ацетилсалициловая кислота, сульфаниламиды, снотворные и др.) или основания (эфедрин, теофиллин и др. алкалоиды) и при физиологических значениях pH лишь слабо ионизированы. Ионизированные формы лекарственных веществ хорошо растворимы в воде и плохо – в

липидов, поэтому практически не переходят через мембраны путем диффузии. Сравнительно небольшое число лекарственных веществ относится к сильным основаниям или кислотам, к примеру – курареподобные средства, некоторые ганглиолитики, антибиотики и др. Эти вещества при физиологических значениях pH полностью ионизированы и поэтому практически не всасываются путем диффузии, а переносятся путем активного транспорта, облегченной диффузии или фильтрации.

### *Цель*

Знакомство с разнообразием, строением и свойствами биологических мембран, а также методом количественного определения малонового диальдегида – продукта перекисного окисления липидов клеточных мембран.

### *Вопросы для самоподготовки*

1. Назовите основные функции биологических мембран.
2. Перечислите разнообразие биологических мембран.
3. Охарактеризуйте структурную организацию биологических мембран, строение и свойства мембранных липидов.
4. Назовите белки мембран, их классификацию по расположению в мембране и функциям.
5. Охарактеризуйте свойства мембран (замкнутость, избирательная проницаемость и др.).
6. Назовите виды трансмембранного переноса.
7. Назовите особенности везикулярного транспорта (эндо- и экзоцитоз).
8. Охарактеризуйте простую и облегченную диффузию.
9. Назовите особенности активного транспорта веществ через мембраны.
10. Охарактеризуйте липосомы как модельную систему биомембран. Приведите примеры их применения в медицине.

## Лабораторная работа 1

### **Количественное определение малонового диальдегида в гомогенате печени крыс**

Процессы ПОЛ активируются при хроническом стрессе, сопровождающем болевой синдром, при тканевой гипоксии, повышении активности эндогенных фосфолипаз, липосомальных эндопептидаз, а также при гипербарической оксигенации, вследствие образования активных форм кислорода ( $\text{OH}^*$ -гидроксильный радикал;  $\text{O}_2^-$ -супероксиданион;  $\text{H}_2\text{O}_2$ -перекись



водорода), которые обладают токсичностью. Механизм их токсического действия обусловлен, главным образом, инициацией свободнорадикальных цепных реакций, приводящих к повреждению липидов. Наиболее чувствительными к их воздействию являются полиеновые жирные кислоты, локализованные в фосфолипидах мембран. При окислении жирных кислот образуются перекиси, чем обусловлено название процесса.

Легче всего свободные радикалы кислорода отрывают электрон от  $\text{CH}_2$ -групп, находящихся между 2 двойными связями. При этом образуется свободный радикал жирной кислоты. Затем в результате развития цепной реакции образуются перекиси и гидроперекиси липидов. В результате этого процесса изменяются свойства мембран. Появление гидрофильных зон в мембранах ведет к проникновению воды, вызывая набухание клеток и изменение их внутреннего состава.

Одним из конечных продуктов деградации жирных кислот при ПОЛ является малоновый диальдегид.

#### *Принцип метода*

Метод определения продуктов ПОЛ основан на том, что при нагревании в кислой среде часть продуктов ПОЛ, относящихся к классу эндоперекисей, разлагается с образованием малонового диальдегида (МДА), связывание молекулы которого с 2 молекулами тиобарбитуровой кислоты (ТБК) приводит к образованию окрашенного комплекса.

*Материал исследования:* супернатант гомогената печени крыс

#### *Реактивы*

1) Тиобарбитуровая кислота, 0,75% раствор; 2) 10% раствор ТХУ; 3) Аскорбиновая кислота ( $M_m=179$ ). Внесение навески в пробу производят *ex tempore* до конечной концентрации 0,8 мМ.

#### *Проведение анализа:*

К 7,0 мл полученного супернатанта добавляют 7,0 мл среды для получения гомогената. Для определения исходного содержания МДА в ткани отбирают 1,0 мл полученной смеси, прибавляют к нему 1,0 мл холодной 10 % ТХУ.

Оставшуюся смесь используют для определения: 1) активности спонтанного ПОЛ и 2) активности ПОЛ в присутствии аскорбиновой кислоты. Для этого смесь делят на две порции. Первую порцию инкубируют без аскорбиновой кислоты (спонтанное ПОЛ), вторую порцию – в присутствии аскорбиновой кислоты, используя такую навеску аскорбиновой кислоты, чтобы её конечная концентрация в

объеме второй порции составляла 0,8 мМ. Навеску растворяют непосредственно в объеме 2-й порции смеси. Обе порции инкубируют при 37° С в термостате.

Отбор проб (по 1,0 мл) из каждой порции для определения содержания МДА осуществляют в два параллельных ряда пробирок через 5, 10, 20, 30, 40 и 50 мин от начала инкубации. Реакцию перекисного окисления в каждой из отобранных проб останавливают добавлением 1,0 мл холодной 10 % ТХУ.

Ко всем полученным пробам приливают по 0,5 мл 0,75 % ТБК и помещают их в кипящую водяную баню на 15 мин. Содержимое пробирок окрашивается в розовый цвет. Пробы охлаждают, осадок белка удаляют центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин. Оптическую плотность надосадочной жидкости измеряют в кювете толщиной 1,0 см при длине волны 532 нм против контрольной пробы, куда вместо гомогената вносят 1,0 мл среды для получения гомогената и обрабатывают в тех же условиях, что и опытные образцы.

#### *Расчет*

Расчет содержания МДА в пробах проводят с использованием коэффициента молярной экстинкции  $\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  и выражают в мкмоль/мг белка в пробе.

### **ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ПО РАЗДЕЛУ «БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ»**

1. ЭНЕРГООБРАЗУЮЩУЮ ФУНКЦИЮ ОСУЩЕСТВЛЯЕТ МЕМБРАНА:
  - 1) плазматическая
  - 2) ядерная
  - 3) митохондриальная
2. НАЛИЧИЕ ТРАНСЛОКАЗ ПОЗВОЛЯЕТ МИТОХОНДРИЯМ:
  - 1) поддерживать электрический потенциал на мембране
  - 2) пропускать только определенные вещества
  - 3) участвовать в синтезе белков
  - 4) совершать постоянный обмен АДФ и АТФ
  - 5) получать необходимое количество фосфатов
3. ТРАНСПОРТ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ ТАКИХ ВЕЩЕСТВ КАК O<sub>2</sub>, СТЕРОИДЫ, ТИРЕОИДНЫЕ ГОРМОНЫ, ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ, ЭТАНОЛ, СО<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ ПУТЕМ:
  - 1) активного транспорта

- 2) эндоцитоза
  - 3) простой диффузии
4. ПОГЛОЩЕНИЕ ЖИДКОСТИ И РАСТВОРЕННЫХ В НЕЙ ВЕЩЕСТВ ПРОИСХОДИТ ПУТЕМ:
- 1) фагоцитоза
  - 2) эндоцитоза
  - 3) пиноцитоза
5. ПЕРЕНОС ДВУХ РАЗНЫХ ВЕЩЕСТВ ПО ГРАДИЕНТУ КОНЦЕНТРАЦИИ С ПОМОЩЬЮ ТРАНСЛОКАЗ НАЗЫВАЕТСЯ:
- 1) пассивный симпорт
  - 2) пассивный антипорт
  - 3) пассивный унипорт

## РАЗДЕЛ 8. ВВЕДЕНИЕ В ОБМЕН ВЕЩЕСТВ И ЭНЕРГИИ.

### ТЕМА 8.1. БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ

#### *Актуальность*

Биологическое окисление протекает во всех живых клетках организма в виде совокупных окислительных реакций. Основной функцией этого процесса является обеспечение организма энергией для процессов жизнедеятельности. Основной формой запасания энергии, доступной для использования, является аденозинтрифосфорная кислота (АТФ). Синонимом биологического окисления является тканевое дыхание. Процесс биологического окисления протекает многостадийно с участием промежуточных ферментативных реакций. Происходит многократная передача протонов и электронов или только электронов от донора к акцептору. Конечным акцептором электронов и протонов служит  $\frac{1}{2}\text{O}_2$ . Конечными продуктами тканевого дыхания являются вода окисления и диоксид углерода ( $\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{CO}_2$ ). Процесс фосфорилирования, сопряженный с тканевым дыханием, называется окислительным фосфорилированием. Чрезвычайно важной функцией цепи дыхательных ферментов митохондрий наряду с передачей электронов является аккумуляция части освобождающейся энергии в фосфатных связях макроэргических соединений.

#### *Цель*

Изучение этапов биологического окисления; механизмов функционирования основных ферментов; способов синтеза АТФ; процессов образования конечных продуктов тканевого дыхания.

#### *Вопросы для самоподготовки:*

6. Понятие об обмене веществ, катаболических и анаболических путях.
7. Укажите взаимосвязь обмена веществ и обмена энергии.
8. В каком виде энергия поступает в организм человека?
9. Назовите этапы катаболизма питательных веществ в организме.
10. Назовите роль АТФ в метаболизме и функции клетки. Что называют циклом АТФ-АДФ?
11. Назовите понятие биологическое окисление, его особенности и значение процесса.
12. Укажите структуру митохондрий.

13. Охарактеризуйте специфические и неспецифические этапы биологического окисления, их локализацию. Напишите химизм окислительного декарбоксилирования пирувата и ЦТК.
14. Какие ферменты выполняют роль первичных акцепторов водорода при окислении субстратов. Укажите механизмы их функционирования.
15. Назовите формы трансформации свободной энергии: образование активных форм водорода (НАДН·Н<sup>+</sup> и др.), синтез "макроэргических" соединений (АТФ, 1,3-дифосфоглицерат, креатинфосфат, ацил~S-КоА и др).
16. Назовите способы фосфорилирования (синтеза АТФ) в биологическом окислении.
17. Укажите строение и функционирование митохондриальной дыхательной цепи, величину редокс-потенциала переносчиков электронов.
18. Назовите механизм сопряжения окисления и фосфорилирования. Охарактеризуйте хемиосмотическую гипотезу окислительного фосфорилирования.
19. Что называют дыхательным контролем? Охарактеризуйте основной механизм регуляции сопряжения окисления и фосфорилирования.
20. Что называют коэффициентом P/O?
21. Какой процесс называется свободным окислением? Назовите разобщители окисления и фосфорилирования.
22. Охарактеризуйте процессы образования CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>O – конечных продуктов тканевого дыхания.
23. Назовите применение нуклеотидов (АТФ, АДФ, АМФ, ФМН) в качестве лекарственных препаратов.

### **ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ПО РАЗДЕЛУ «ВВЕДЕНИЕ В ОБМЕН ВЕЩЕСТВ И ЭНЕРГИИ»**

24. ФЕРМЕНТЫ ЦИКЛА ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ РАСПОЛАГАЮТСЯ:
  - 1) на внутренней мембране митохондрий
  - 2) в матриксе митохондрий
  - 3) в цитоплазме клетки
25. ОСНОВНАЯ ФУНКЦИЯ ЦИКЛА ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ В БИОЛОГИЧЕСКОМ ОКИСЛЕНИИ ЗАКЛЮЧАЕТСЯ:
  - 1) в образовании двух молекул CO<sub>2</sub>
  - 2) выделение энергии моля ГТФ (АТФ)

- 3) в генерации водорода (образование 3НАДН и 1ФАДН<sub>2</sub>)
26. К РЕАКЦИЯМ ДЕГИДРИРОВАНИЯ В ЦИКЛЕ КРЕБСА ОТНОСЯТ ПРЕВРАЩЕНИЯ:
- 1) цитрат в изоцитрат
  - 2) α-кетоглутарата в сукцинил-КоА
  - 3) малата в оксалоацетат
  - 4) сукцината в фумарат
  - 5) фумарата в малат
  - 6) изоцитрата в α-кетоглутарат
27. КОЛИЧЕСТВО РЕАКЦИЙ ДЕГИДРИРОВАНИЯ В ЦИКЛЕ КРЕБСА:
- 1) три
  - 2) четыре
  - 3) пять
28. РАЗОБЩИТЕЛЕМ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ ЯВЛЯЕТСЯ:
- 1) малат
  - 2) 2,4-динитрофенол
  - 3) сукцинат
  - 4) цитрат
  - 5) жирные кислоты
29. К СУБСТРАТАМ ОКИСЛЕНИЯ В ЦИКЛЕ КРЕБСА ОТНОСЯТ:
- 1) оксалоацетат
  - 2) сукцинат
  - 3) малат
  - 4) фумарат
  - 5) изоцитрат
  - 6) α-кетоглутарат
30. ПРИ ОКИСЛЕНИИ 1 МОЛЯ АЦЕТИЛ-КОА ДО СО<sub>2</sub> И Н<sub>2</sub>О ОБРАЗУЕТСЯ:
- 1) 5 АТФ
  - 2) 1 АТФ
  - 3) 10 АТФ
  - 4) 12 АТФ
31. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ РЕАКЦИЙ В ЦПЭ ОПРЕДЕЛЯЕТСЯ:
- 1) строением окисляемого субстрата
  - 2) величинами окислительно-восстановительных потенциалов компонентов ЦПЭ
  - 3) локализацией ферментов в митохондриальной мембране
  - 4) прочностью связи апоферментов с коферментами.

## РАЗДЕЛ 9. ОБМЕН И ФУНКЦИИ УГЛЕВОДОВ

### ТЕМА 9.1. СТРОЕНИЕ И ВНЕШНИЙ ОБМЕН УГЛЕВОДОВ

#### *Актуальность*

В организме человека и животных углеводы играют важную роль и выполняют разнообразные функции: 1) служат источником энергии, обеспечивая до 67% суточного энергопотребления организма; 2) являются пластическим материалом клеток; 3) используются в качестве исходных продуктов для синтеза липидов, белков и нуклеиновых кислот; 4) углеводные компоненты иммуноглобулинов участвуют в поддержании иммунитета. Основным источником углеводов организма являются различные пищевые продукты, главным образом, растительного происхождения. Суточная норма потребления углеводов составляет 450-500 г. Углеводы, поступающие в организм, подвергаются перевариванию в желудочно-кишечном тракте и всасываются в кровь в виде моносахаридов. Особая роль в рационе питания человека принадлежит неперевариваемым и неусваиваемым полисахаридам, в первую очередь, целлюлозе. В некоторых тканях часть глюкозы откладывается в виде гликогена. К заболеваниям, связанным с патологией углеводного обмена, относятся сахарный диабет, гликогенозы, мукополисахаридозы, галактоземии, фруктоземии, наследственная непереносимость углеводов.

#### *Цель*

Практическое знакомство с влиянием пищеварительных соков на полисахариды пищи и методами выявления глюкозурии.

#### *Вопросы для самоподготовки:*

1. Укажите структуру основных представителей моно-, ди-, полисахаридов (рибоза, глюкоза, фруктоза, галактоза, мальтоза, лактоза, сахароза, крахмал, гликоген, целлюлоза), их биологическую роль, а также сходство и отличие в структуре крахмала, гликогена и целлюлозы.
2. Охарактеризуйте структуру гликозаминогликанов (мукополисахаридов): гиалуроновой, хондроитинсерной, нейраминовой, сиаловой кислот, гепарина. Назовите их биологическую роль.
3. Назовите углеводы, поступающие в организм человека с пищей, а также суточную потребность в углеводах.

4. Назовите ферменты пищеварительных соков, участвующие в переваривании углеводов. Пути всасывания моносахаридов из кишечника в кровь.
5. Назовите причины неперевариваемости целлюлозы в желудочно-кишечном тракте человека. Роль целлюлозы в рационе питания человека.
6. Назовите пути проникновения углеводов в клетки тканей (роль переносчиков – ГЛЮТ) и пути их внутриклеточного превращения.
7. Назовите значение реакций фосфорилирования глюкозы в клетке, локализацию глюкокиназы и гексокиназы в тканях организма.
8. Охарактеризуйте синтез гликогена и регуляцию процесса депонирования.
9. Какой процесс называется мобилизацией гликогена? Назовите регуляцию процесса.
10. Укажите физиологическое значение и соотношение процессов обмена гликогена в зависимости от ритма питания и режима работы мышц.
11. Назовите особенности обмена гликогена в печени и мышцах.
12. Охарактеризуйте аденилатциклазный механизм регуляции активности ферментов обмена гликогена. Роль цАМФ и влияние адреналина, глюкагона и инсулина на концентрацию цАМФ в клетке.
13. Назовите биохимические основы наследственных нарушений переваривания углеводов и обмена гликогена (лактозная интолерантность, непереносимость сахарозы, гликогенозы и агликогенозы).

Лабораторная работа 1  
**Исследование влияния амилазы  
на крахмал и целлюлозу**

Крахмал является гомополисахаридом, состоящим из амилопектина и  $\alpha$ -амилозы. В  $\alpha$ -амилозе остатки глюкозы связаны между собой  $\alpha$ -(1→4)-гликозидными связями, в амилопектине –  $\alpha$ -(1→4)-гликозидными связями и  $\alpha$ -(1→6)-гликозидными связями. Целлюлоза является гомополисахаридом, в котором остатки глюкозы связаны между собой  $\beta$ -(1→4)-гликозидными связями.

Фермент  $\alpha$ -амилаза гидролизует только  $\alpha$ -(1→4)-гликозидные связи.



**Принцип**

Ферменты, содержащиеся в биологических жидкостях, расщепляют полисахариды. Продукты гидролиза полисахаридов определяют с помощью реакции Троммера.

**Материал исследования**

1) 1% раствор крахмала, 2) 1% водная суспензия целлюлозы.

**Реактивы**

1) Желудочный сок; 2) 5% раствор панкреатина; 3) слюна, разведение (1:5); 4) 1% раствор  $\text{CuSO}_4$ ; 5) 10% раствор  $\text{NaOH}$ .

**Проведение анализа**

Готовят пробы соответственно таблице:

<b>№ пробы</b>	<b>Крахмал, мл</b>	<b>Суспензия целлюлозы, мл</b>	<b>Слюна, мл</b>	<b>Желудочный сок, мл</b>	<b>Панкреатин, мл</b>
1	1,0	–	1,0	–	–
2	1,0	–	–	1,0	–
3	1,0	–	1,0	1,0	–
4	1,0	–	–	–	2,0
5	–	1,0	1,0	–	–
6	–	1,0	–	1,0	–
7	–	1,0	1,0	1,0	–
8	–	1,0	–	–	2,0

Затем для инкубации пробирки помещают в водяную баню при  $37^\circ\text{C}$  на 30 мин.

После инкубации содержимое каждой пробирки анализируют на присутствие продуктов расщепления полисахарида с помощью реакции Троммера. Для этого в каждую из 8 пробирок добавляют по 1 мл раствора  $\text{NaOH}$  и по 5 капель раствора  $\text{CuSO}_4$ . Ставят все пробирки в кипящую водяную баню и кипятят в течение 1 мин. Появление красного осадка меди оксида (I) указывает на положительную реакцию Троммера в присутствии глюкозы и мальтозы.

**Оформление работы**

Результаты оформляют в виде таблицы:

<b>№ пробы</b>	<b>Субстрат</b>	<b>Источник фермента</b>	<b>Фермент</b>	<b>Результаты</b>

Сделать вывод об особенностях переваривания крахмала и целлюлозы в пищеварительном тракте и объяснить их.

## Лабораторная работа 2

### Качественные реакции на глюкозу в моче

В клинической практике для определения глюкозы в моче пользуются реакциями Троммера и Фелинга.

#### *Реактивы*

1) 1% раствор глюкозы, 2) 1% раствор  $\text{CuSO}_4$ ; 3) 10% раствор  $\text{NaOH}$ ; 4) Реактив Фелинг I, содержащий  $\text{NaOH}$ , 5) Реактив Фелинг II, содержащий раствор  $\text{CuSO}_4$ .

#### *Материал исследования*

Моча нормальная и патологическая (содержащая глюкозу).

#### *А. РЕАКЦИЯ ТРОММЕРА*

##### *Принцип*

Реакция основана на способности глюкозы восстанавливать при нагревании в щелочной среде  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  голубого цвета в  $\text{CuOH}$  желтого цвета и  $\text{Cu}_2\text{O}$  красного цвета.

##### *Проведение анализа*

Проводят соответственно таблице:

	<b>1 проба</b>	<b>2 проба</b>	<b>3 проба</b>
Глюкоза	5 капель	–	–
Нормальная моча	–	5 капель	–
Патологическая моча	–	–	5 капель
Раствор $\text{NaOH}$	15 капель	15 капель	15 капель
Раствор $\text{CuSO}_4$	5 капель	5 капель	5 капель

#### *Б. РЕАКЦИЯ ФЕЛИНГА*

##### *Принцип*

Реакция Фелинга основана на том же принципе, что и реакция Троммера. Отличие и преимущество этой реакции заключается в том, что Фелинг предложил прибавлять сегнетовую соль для стабилизации катионов  $\text{Cu}^{2+}$ , что препятствует образованию из них при нагревании черного осадка  $\text{CuO}$  и искажению полученных результатов.

*Проведение анализа*

	<b>1 проба</b>	<b>2 проба</b>	<b>3 проба</b>
Глюкоза	5 капель	–	–
Нормальная моча	–	5 капель	–
Патологическая моча	–	–	5 капель
Раствор Фелинг I	2 капли	2 капли	2 капли
Раствор Фелинг II	2 капли	2 капли	2 капли

*Нормальные значения*

Моча                                  проба отрицательна

*Оформление работы*

Записывают принцип методов. Результаты оформляют в виде таблицы:

<b>Реакция</b>	<b>Исследуемый материал</b>	<b>Результат</b>
Реакция Троммера Реакция Фелинга		

По результатам анализа делается вывод о присутствии глюкозы в моче.

*Нормальные величины*

Моча                                  0,06–0,83 ммоль/л

*Практическое значение*

Глюкозурия наиболее часто сопровождается гипергликемией, когда содержание глюкозы в крови превышает величину почечного порога (9,9 ммоль/л). Глюкозурии могут быть физиологическими и патологическими. К физиологическим относятся алиментарная глюкозурия, глюкозурия беременных и нейрогенная глюкозурия при стрессовых состояниях. Патологическая глюкозурия возникает чаще всего в результате нарушений обмена углеводов при патологических изменениях в поджелудочной железе: сахарный диабет, острый панкреатит, а также при других нарушениях: тиреотоксикозе, акромегалии, гиперплазии коры надпочечников, инфаркте миокарда, кровоизлияниях во внутренние органы, отравлениях морфином, фосфором, при острых инфекциях и нервных заболеваниях.

При нормогликемии глюкозурия может выявляться при повреждениях почечных канальцев – пиело- и гломерулонефриты, токсические поражения, почечный диабет (семейная почечная глюкозурия), нефропатии.

## ТЕМА 9.2. АНАЭРОБНЫЕ ПУТИ ПРЕВРАЩЕНИЯ УГЛЕВОДОВ В КЛЕТКАХ

### *Актуальность*

Гликолиз – центральный путь катаболизма глюкозы. В анаэробных условиях гликолиз – единственный процесс в организме, поставляющий энергию. Именно благодаря гликолизу организм определенный период времени может осуществлять ряд физиологических функций в условиях гипоксии. У некоторых анаэробных организмов, таких как дрожжи, а также в некоторых клетках высших организмов, например, в эритроцитах, анаэробное превращение углеводов является единственным процессом, продуцирующим АТФ и поддерживающим их целостность и функции. В аэробных условиях гликолиз представляет собой начальную стадию расщепления энергетических ресурсов, завершающуюся аэробным окислением образовавшихся промежуточных продуктов. Гликолиз поставляет также углеродный скелет для процессов биосинтеза в клетке.

### *Цель*

Ознакомление с методами изучения гликолиза: поглощение неорганического фосфата и обнаружение молочной кислоты.

### *Вопросы для самоподготовки:*

1. Назовите важнейшие пути превращения глюкозы в тканях. Роль глюкозо-6-фосфата во внутриклеточном метаболизме глюкозы.
2. Какой процесс называется гликолизом? Напишите химизм процесса. Укажите ферменты, а также его локализацию, энергетический эффект, суммарное уравнение.
3. Напишите реакции гликолиза, сопряженные с потреблением АТФ; реакции гликолиза, сопряженные с синтезом АТФ. Охарактеризуйте способ субстратного фосфорилирования, и его значение.
4. Укажите судьбу восстановленного НАД, образовавшегося при окислении глицеральдегид-3-фосфата. Назовите значение цикла гликолитической оксиредукции.
5. Какой процесс называется гликогенолизом? Напишите химизм, укажите ферменты, суммарное уравнение. Сравните энергетический эффект процессов: гликогенолиза и гликолиза.
6. Какой процесс называется спиртовым брожением? Укажите локализацию, суммарное уравнение, энергетический эффект, сходство и отличие от гликолиза. Влияние этилового алкоголя на

обмен углеводов в организме человека. Причины гиперлактатемии и гипогликемии при острой алкогольной интоксикации.

7. Охарактеризуйте метаболизм фруктозы и галактозы. Назовите биохимические основы фруктозурии и галактоземии.
8. Назовите предшественники глюкозы в глюконеогенезе, специфические реакции, последовательность реакций, ферменты, локализацию глюконеогенеза, суммарное уравнение, расход энергии для синтеза 1 молекулы глюкозы.
9. Что называют глюкозо-лактатным циклом (цикл Кори)? Глюкозо-аланиновым циклом? Назовите их значение при длительной физической работе и голодании.
10. Назовите регуляторные ферменты гликолиза и глюконеогенеза, их аллостерические эффекторы и гормоны, влияющие на эти процессы.

### Лабораторная работа 1

#### **Анаэробный гликолиз в мышечной ткани**

Анаэробным гликолизом называется распад глюкозы до молочной кислоты в отсутствии кислорода.

##### *Принцип*

О протекании гликолиза можно судить по уменьшению содержания неорганического фосфата в инкубационной среде. Под влиянием ферментов, содержащихся в мышечной ткани, происходит фосфоролитический распад глюкозы с образованием фосфорных эфиров гексоз, триоз, а также АТФ. При фосфорилировании связывается неорганический фосфат, концентрация которого в растворе понижается. Количество неорганического фосфата определяют по реакции образования комплексной фосфорно-молибденовой кислоты с последующим ее восстановлением в молибденовую синь.

*Материал исследования:* мышечная кашица.

##### *Реактивы*

1) Фосфатный буфер (рН 8,0); 2) 10% раствор ТХУ, 3) 5% раствор молибдата аммония в 2,5М  $H_2SO_4$  ; 4) 0,5% раствор аскорбиновой кислоты; 5) 1% раствор глюкозы; 6) вазелиновое масло.

*Проведение анализа*

Работу проводят по этапам в соответствии с таблицей:

	<b>Опыт, мл</b>	<b>Контроль 1, мл</b>	<b>Контроль 2, мл</b>
<b>1. Приготовление инкубационной смеси.</b>			
Фосфатный буфер	2,0	2,0	2,0
Раствор глюкозы	1,0	1,0	1,0
Раствор ТХУ	–	1,0	1,0
Мышечная кашица	0,5	0,5	–
	Перемешать. Хорошо закрыть пробками для изоляции от кислорода воздуха или добавить по 10 капель вазелинового масла. Инкубировать при 37°C в водяной бане в течение 30 мин.		

**2. Осаждение белков и прекращение гликолиза.**

Раствор ТХУ	1,0	–	–
	Содержимое каждой пробы профильтровывают через смоченный водой фильтр в соответственно пронумерованную пробирку		

**3. Определение концентрации неорганического фосфата**

Безбелковый фильтрат	1,0	1,0	1,0
Раствор молибдата аммония	1,0	1,0	1,0
Раствор аскорбиновой кислоты	0,5	0,5	0,5
Дистилл. вода	7,5	7,5	7,5
	Перемешивают. Через 10-15 мин сравнивают интенсивность синего окрашивания на фотоэлектроколориметре. Окраска опытной пробы менее выражена вследствие использования неорганического фосфата в процессе гликолиза.		

*Оформление работы*

Записать суммарное уравнение гликолиза. Указать принцип метода. Результаты оформляют в виде таблицы:

<b>Проба</b>	<b>Источник ферментов гликолиза</b>	<b>Источник неорганического фосфора</b>	<b>Субстрат</b>	<b>Результаты</b>
Опыт				
Контроль 1				
Контроль 2				

Сделать вывод о возможности утилизации неорганического фосфата мышечной тканью.

## Лабораторная работа 2

### **Обнаружение молочной кислоты в мышечной ткани с помощью реакции Уффельмана**

Молочная кислота является конечным продуктом анаэробного гликолиза и гликогенолиза. Она образуется в мышцах, например, при мышечной нагрузке как физиологического, так и патологического характера (приступ эпилепсии, столбняк, тетания и другие судорожные состояния); гипоксии, связанной с сердечной и легочной недостаточностью; анемии и других нарушениях.

#### *Принцип*

Метод основан на взаимодействии комплексного соединения фенолята железа фиолетового цвета с молочной кислотой с образованием лактата железа желто-зеленого цвета.

*Материал исследования:* мышечная кашица.

#### *Реактивы*

1) Фосфатный буфер, pH 7,2; 2) 1% раствор фенола; 3) 1% раствор  $\text{FeCl}_3$ .

#### *Проведение анализа*

Приготовление экстракта мышечной ткани: кусочек мышечной ткани тщательно растирают в ступке с 5,0 мл фосфатного буферного раствора, перемешивают. Полученную мышечную кашицу фильтруют через 2 слоя марли.

Цветная реакция на молочную кислоту. В пробирке к 10 каплям раствора фенола добавляют раствор  $\text{FeCl}_3$  до появления фиолетовой окраски. Затем к содержимому пробирки добавляют 3 капли экстракта мышц и наблюдают за изменением окраски. В присутствии молочной кислоты фиолетовая окраска раствора переходит в желто-зеленую вследствие образования лактата железа.

#### *Оформление работы:*

Записывают принцип метода. Делают вывод о присутствии молочной кислоты и кислородном снабжении мышцы.

### ТЕМА 9.3. АЭРОБНЫЕ ПУТИ ПРЕВРАЩЕНИЯ УГЛЕВОДОВ

#### *Актуальность*

Аэробный распад глюкозы – основной путь ее катаболизма для аэробных организмов. При аэробном распаде глюкозы выделяется гораздо больше энергии, чем при анаэробном гликолизе. Промежуточные продукты окислительного катаболизма глюкозы используются также в качестве предшественников при биосинтезе аминокислот, липидов и других биомолекул. В наибольшей зависимости от аэробного распада глюкозы находится мозг. Он расходует около 100 г глюкозы в сутки.

Другое анаэробное превращение глюкозы – пентозофосфатный цикл, выполняет анаболическую функцию. Пентозофосфатный цикл обеспечивает клетку НАДФН для восстановительного синтеза и пентозами для синтеза нуклеотидов.

#### *Цель*

Освоение метода количественного определения глюкозы в крови и построения гликемических кривых.

#### *Вопросы для самоподготовки:*

1. Назовите пути аэробного катаболизма глюкозы, укажите специфические и общие этапы катаболизма.
2. Охарактеризуйте аэробное окисление глюкозы до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$  как основной путь катаболизма аэробных организмов. Напишите химизм процесса, ферменты, суммарное уравнение, энергетический эффект.
3. Назовите особенности анаэробного и аэробного гликолиза, переключение анаэробного пути распада углеводов на аэробный. Что называют эффектом Пастера?
4. Укажите выход АТФ при аэробном распаде глюкозы, отличие от анаэробного гликолиза. Назовите роль аэробного распада глюкозы в мышцах при мышечной работе, а также роль аэробного распада глюкозы в мозге.
5. Охарактеризуйте общий путь катаболизма. Назовите основные стадии и их значение.
6. Напишите химизм окислительного декарбоксилирования пирувата, укажите строение полиферментного пируватдегидрогеназного комплекса.
7. Напишите химизм цикла трикарбоновых кислот, назовите ферменты, их роль в генерации водорода для митохондриальной дыхательной цепи.



8. Охарактеризуйте процесс продуцирования энергии на митохондриальной дыхательной цепи. Укажите механизм сопряжения процессов окисления и фосфорилирования.
9. Назовите роль глицеролфосфатного и малат-аспартатного челночных механизмов при аэробном окислении глюкозы до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ , их локализацию в тканях организма.
10. Напишите химизм пентозофосфатного пути окисления глюкозы: реакции окислительного и неокислительного образования пентоз. Назовите ферменты, распространение и роль пентозофосфатного пути, взаимосвязь процесса с гликолизом.
11. Назовите уровень глюкозы в крови и ее источники. Укажите понятия гипо- и гипергликемии, их возможные причины.
12. Охарактеризуйте гормональную регуляцию обмена углеводов, влияние инсулина и контринсулярных гормонов на процессы превращения глюкозы в клетках.
13. Охарактеризуйте нарушения обмена углеводов при сахарном диабете, укажите диагностическое значение гликемических кривых.
14. Назовите осложнения сахарного диабета.
15. Назовите изменения углеводного обмена при гипоксических состояниях.

### Лабораторная работа 1

#### **Количественное определение**

#### **глюкозы в сыворотке крови глюкозооксидазным методом**

Благодаря наличию сложных механизмов регуляции, включающих центральную нервную, эндокринную системы и деятельность печени, содержание глюкозы в крови здорового человека довольно постоянно и колеблется от 3,33 до 5,55 ммоль/л. Отклонения от этих величин в сторону увеличения содержания глюкозы называется гипергликемией (гиперглюкоземией), в сторону уменьшения – гипогликемией (гипоглюкоземией).

Для количественного определения глюкозы в диагностической практике используются следующие методы:

1. Колориметрические методы – основаны на определении степени интенсивности окраски соединений, образующихся при взаимодействии глюкозы с определенными веществами (ортотолуидиновый метод). Метод специфичен и точен.

2. Ферментативные (энзиматические) методы – основаны на окислении глюкозы до глюконовой кислоты с помощью фермента

глюкозооксидазы и образовании в ходе реакции перекиси водорода. Далее определяют концентрацию перекиси водорода различными способами.

3. Электрохимические методы, в которых используются электроды, содержащие иммобилизованные ферменты, в частности, глюкозооксидазу. Реакция регистрируется по количеству образованного пероксида водорода или по убыли кислорода, израсходованного на окисление глюкозы.

Специфичным и широко применяемым в клинико-диагностической практике является глюкозооксидазный (энзиматический) метод, которым можно определять глюкозу в сыворотке, плазме крови, цельной крови и спинномозговой жидкости.

#### *Принцип*

Глюкоза с помощью глюкозооксидазы (КФ 1.1.3.4) окисляется до глюконовой кислоты с образованием пероксида водорода. Пероксид водорода в присутствии фермента пероксидазы (КФ 1.11.1.17) окисляет краситель 4-аминоантипирин, превращая его в окрашенное соединение. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию глюкозы и определяется фотоколориметрически.

*Материал исследования:* сыворотка крови.

#### *Реактивы*

- 1) рабочий реагент, содержащий фенол, глюкозооксидазу, пероксидазу, 4-аминоантипирин в калиево-фосфатном буфере;
- 2) 5,55 ммоль/л стандартный раствор глюкозы.

#### *Проведение анализа*

	<b>ОПЫТ, мл</b>	<b>СТАНДАРТ, мл</b>
Сыворотка	0,01	–
Стандарт глюкозы	–	0,01
Рабочий реагент	3,0	3,0
	Инкубируют в течение 15 мин при 37°C. Измеряют оптическую плотность при длине волны 510-530 нм.	

#### *Расчет*

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

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

*Нормальные величины*

Цельная кровь	
новорожденные	2,22-4,44 ммоль/л
дети	3,33-5,55 ммоль/л
взрослые	3,9-5,8 ммоль/л
Сыворотка крови	
взрослые	3,3-5,8 ммоль/л
Ликвор	
дети	3,33-4,44 ммоль/л
взрослые	2,75-3,85 ммоль/л

*Практическое значение*

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

К физиологической гипергликемии относится алиментарная, возникающая при одномоментном приеме больших количеств легкоусвояемых углеводов – моно- и дисахаридов, и нейрогенная, например, при стрессовых ситуациях в результате выброса в кровь больших количеств катехоламинов. Физиологические гипергликемии носят транзиторный характер и быстро проходят.

Патологические гипергликемии, как правило, обусловлены нейроэндокринными расстройствами, для которых характерно нарушение оптимального соотношения между секрецией гормонов гипо- и гипергликемического действия. Наиболее распространенная причина патологической гипергликемии – сахарный диабет, связанный с абсолютной или относительной инсулиновой недостаточностью. Также гипергликемии сопутствуют некоторым заболеваниям гипофиза, сопровождающимся повышенной секрецией в кровь соматотропина и кортикотропина (акромегалия, болезнь Иценко-Кушинга, опухоли гипофиза и др). Наблюдаются при опухолях мозгового слоя надпочечников, когда усилено образование катехоламинов (феохромоцитомы), и коркового слоя надпочечников с усиленной продукцией глюкокортикоидов, гиперфункции щитовидной железы, а также с поражениями диэнцефальной области и некоторых болезнях печени (инфекционный гепатит, цирроз печени).

К физиологической гипогликемии относят алиментарную гипогликемию, обусловленную усиленным образованием и выбросом в кровь инсулина в ответ на алиментарную гипергликемию; гипогликемию, которая развивается после тяжелой

и длительной мышечной работы, вследствие некомпенсированного значительного потребления углеводов как источника энергии. Иногда гипогликемия возникает у женщин в период лактации в результате усиленного поглощения глюкозы молочной железой. Недостаточное поступление углеводов с пищей и голодание могут явиться причиной гипогликемии.

Патологические гипогликемии наблюдаются при заболеваниях поджелудочной железы, когда развивается гиперплазия  $\beta$ -клеток островков Лангерганса и продуцируется большое количество инсулина – гиперинсулинизм (инсулома, аденома и рак поджелудочной железы). Самая распространенная причина гипогликемий – передозировка инсулина. Гипофункция коры надпочечников (Аддисонова болезнь, опухоли надпочечников), гипофункция и атрофия передней доли гипофиза (болезнь Симмондса), гипофункция щитовидной железы также могут явиться причиной гипогликемии. В этих случаях гипогликемия обусловлена понижением продукции гормонов – антагонистов инсулина. Нейрогенные гипогликемии наблюдаются при заболеваниях нервной системы (энцефалит, прогрессивный паралич и др) и при психических заболеваниях (хронический алкоголизм, циклотемия и др), травмах головного мозга. Гипогликемия может возникать при тяжелых поражениях печени (отравления фосфором, хлороформом, острая желтая дистрофия печени, цирроз и др), гликогенозах (в частности, при болезни Гирке) вследствие невозможности превращения гликогена в глюкозу. Гипогликемия при заболеваниях почек обусловлена потерей значительных количеств глюкозы с мочой вследствие снижения почечного порога для глюкозы. Гипогликемия наблюдается при врожденных дефектах жирового и углеводного обмена в связи с неспособностью организма эффективно мобилизовать свои энергетические ресурсы.

#### *Оформление работы*

Записывают принцип работы, сравнивают полученный результат с нормальными значениями, делают вывод о наличии патологических отклонений.

### Лабораторная работа 2

#### **Влияние сахарной нагрузки на содержание глюкозы в крови (глюкозо-толерантный тест)**

Метод сахарной нагрузки является информативным тестом для выявления скрытой формы сахарного диабета и нарушения

гликогенообразовательной функции печени. Метод сахарной нагрузки называется также глюкозотолерантным тестом (сокращенно ГТТ) или тест на толерантность к глюкозе – ТТГ.

#### *Принцип*

Метод основан на определении содержания глюкозы в крови через определенные промежутки времени после нагрузки глюкозой. Концентрация глюкозы в крови определяется глюкозооксидазным методом, описанным в работе 1.

#### *Материал исследования*

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

#### *Проведение анализа*

В клинических лабораториях пробу с сахарной нагрузкой проводят следующим образом. У обследуемого натощак берут кровь из пальца и определяют в ней содержание глюкозы. Затем дают принять глюкозу или тростниковый сахар (сахароза) из расчета 1,0-1,5 г на 1 кг массы тела в виде раствора. Через 30, 60 и 120 мин после приема сахара повторно берутся образцы крови и в них определяют содержание глюкозы.

На практическом занятии метод сахарной нагрузки можно проводить с готовыми образцами крови, взятыми до нагрузки глюкозой, через 30, 60 и 120 мин после нагрузки.

	Пробы, мл				Стандарт, мл
	до нагрузки	время после нагрузки			
		30 мин	60 мин	120 мин	
	1	2	3	4	5
Рабочий раствор	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Кровь	0,01	0,01	0,01	0,01	–
Стандарт глюкозы	–	–	–	–	0,01
	Содержимое пробирок перемешивают, инкубируют при 37°C в течение 15 мин. Измеряют оптическую плотность при длине волны 510-530 нм (зеленый светофильтр).				

#### *Расчет*

В каждом образце крови рассчитывают концентрацию глюкозы по формуле:

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

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

На основании этих данных строят график, откладывая на оси абсцисс время взятия крови, а на оси ординат – найденное содержание глюкозы в крови. Полученный график называют гликемической или сахарной кривой.

#### *Нормальные величины*

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

$$\text{Коэфф. Бодуэна} = \frac{C_{\text{макс}} - C_{\text{исх}}}{C_{\text{исх}}} \times 100\% = 50\%$$

где  $C_{\text{макс}}$  и  $C_{\text{исх}}$  – соответственно максимальная и исходная концентрация глюкозы в крови во время теста.

$$\text{Коэфф. Рафальского} = \frac{C_{\text{конеч}}}{C_{\text{исх}}} = 0,9-1,04$$

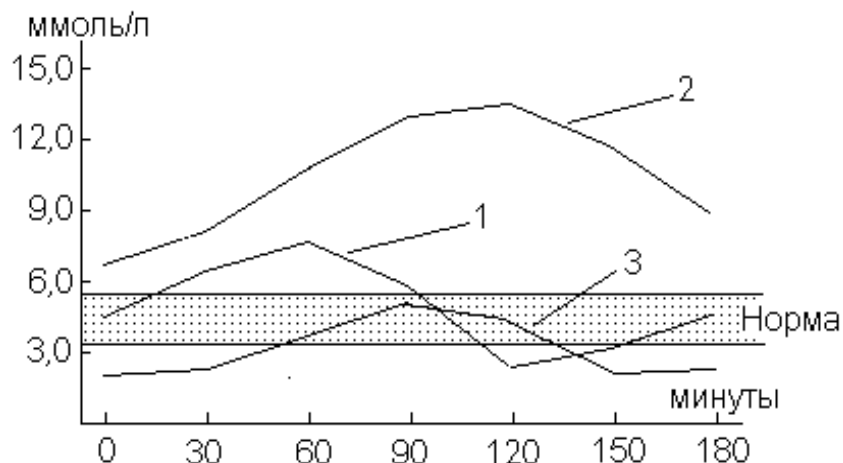
где  $C_{\text{конеч}}$  и  $C_{\text{исх}}$  – соответственно концентрация глюкозы в крови через 2 часа после начала и исходная концентрация.

#### *Практическое значение*

Выделяют несколько видов гликемических кривых:

Параметры	Вид кривых		
	Нормальная	Гипергликемическая	Гипогликемическая
1. Исходный уровень глюкозы	Норма	гипергликемия	Гипогликемия
2. Максимальный подъем	1 ч	2-3 ч	Замедленный, на 2-3 ч
3. Гипогликемическая фаза	2 ч	нет	Резко выражена
4. Содержание глюкозы к концу 3 ч	Исходный уровень	Исходного уровня не достигает	Исходного уровня не достигает

У здорового человека уровень глюкозы в крови после нагрузки глюкозой изменяется следующим образом (см рис):



Типы гликемических кривых:

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

1. Через 30-60 мин после приема глюкозы наблюдается максимальное увеличение содержания глюкозы в крови – на 35-80% выше исходного. Повышение содержания глюкозы в течение первого часа после приема глюкозы объясняется переходом ее в кровь и в значительной мере определяется быстротой всасывания глюкозы, гликогенсинтезирующей функцией печени и всех остальных периферических органов.

2. Через 90-120 мин содержание глюкозы в крови возвращается к норме и в ряде случаев может быть даже ниже исходной величины. Снижение уровня глюкозы в крови в этом периоде объясняется усиленным выделением инсулина из поджелудочной железы в ответ на развивающуюся гипергликемию, и глюкоза переходит в ткани. При этом обычно выделяется больше инсулина, чем это требуется для восстановления нормального уровня глюкозы в крови, что приводит к небольшой гипогликемии.

3. К 150-180 мин уровень глюкозы в крови возвращается к исходному, что обусловлено состоянием равновесия всех систем, участвующих в регуляции уровня глюкозы в крови.

У здорового человека нагрузка глюкозой не вызывает глюкозурию.

Гипергликемические кривые наблюдаются при явных и скрытых формах сахарного диабета, повреждении паренхимы печени, гиперфункции щитовидной железы, коры надпочечников, тяжелых формах анемии, токсикозах, заболеваниях центральной нервной системы, инфекционных заболеваниях (ревматизм, дифтерия, тиф,

дизентерия, сепсис, бронхопневмония), панкреатите, гликогеновой болезни.

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

#### *Оформление работы*

Записывают принцип построения гипергликемических кривых, отмечают полученные значения:

Метод определения глюкозы	Концентрация глюкозы в крови			
	до нагрузки	время после нагрузки		
		30 мин	60 мин	120 мин

### **ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ПО РАЗДЕЛУ «ОБМЕН И ФУНКЦИИ УГЛЕВОДОВ»**

1. ОСНОВНОЙ ПРОЦЕСС ПЕРЕВАРИВАНИЯ УГЛЕВОДОВ ПРОИСХОДИТ:
  - 1) в ротовой полости
  - 2) желудке
  - 3) тонком кишечнике.
2. В ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОМ ТРАКТЕ УГЛЕВОДЫ ГИДРОЛИЗУЮТСЯ ПОД ДЕЙСТВИЕМ:
  - 1) липазы
  - 2) амилазы
  - 3) пепсина
  - 4) мальтазы
  - 5) сахаразы
3. КОНЕЧНЫМ ПРОДУКТОМ АНАЭРОБНОГО ГЛИКОЛИЗА ЯВЛЯЕТСЯ:
  - 1) пируват
  - 2) лактат
  - 3) этанол и CO<sub>2</sub>
  - 4) пируват и лактат
  - 5) пропионат
4. ПРИ УМЕНЬШЕНИИ ИНСУЛИН-ГЛЮКАГОНОВОГО ИНДЕКСА СТИМУЛИРУЕТСЯ:
  - 1) глюконеогенез
  - 2) гликолиз



- 3) синтез гликогена
  - 4) пентозофосфатный путь
  - 5) распад гликогена
5. В КАЧЕСТВЕ СУБСТРАТОВ ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗА ИСПОЛЬЗУЮТСЯ:
- 1) ацетил-КоА
  - 2) лактат
  - 3) глицерин
  - 4) аминокислоты
  - 5) жирные кислоты
6. В ПОСТАБСОРБТИВНЫЙ ПЕРИОД В ПЕЧЕНИ АКТИВИРУЕТСЯ:
- 1) распад гликогена
  - 2) синтез гликогена
  - 3) глюконеогенез
  - 4) гликолиз
7. В АБСОРБТИВНЫЙ ПЕРИОД В ПЕЧЕНИ АКТИВИРУЕТСЯ:
- 1) синтез гликогена
  - 2) поступление глюкозы в клетки
  - 3) глюконеогенез
  - 4) распад гликогена
  - 5) энергетическое использование глюкозы (гликолиз и др.)
8. ПРИ ИНТЕНСИВНОЙ ФИЗИЧЕСКОЙ РАБОТЕ В МЫШЦАХ АКТИВИРУЕТСЯ:
- 1) спиртовое брожение
  - 2) глюконеогенез
  - 3) гликолиз
  - 4) гликогенолиз.
9. ПУТЕМ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ АКТИВИРУЕТСЯ ФЕРМЕНТ:
- 1) аденилатциклаза
  - 2) гликогенсинтаза
  - 3) гликогенфосфорилаза
10. ЭФФЕКТОМ ПАСТЕРА НАЗЫВАЮТ:
- 1) снижение потребления глюкозы и прекращение накопления лактата
  - 2) торможение окисления глицеральдегид-3-фосфата
  - 3) торможение процесса окислительного фосфорилирования
11. БИОСИНТЕЗ ГЛИКОГЕНА КАТАЛИЗИРУЕТ ФЕРМЕНТ:
- 1)  $\alpha$ -1,6-глюкозидаза
  - 2) гликогенфосфорилаза

3) гликогенсинтаза

## 12. ОСНОВНОЕ НАЗНАЧЕНИЕ ПЕНТОЗОФОСФАТНОГО ПУТИ ЗАКЛЮЧАЕТСЯ:

- 1) в окислении глюкозы
- 2) в генерации НАДФН
- 3) в снабжении пентозами для синтеза нуклеиновых кислот
- 4) в снабжении субстратом глюконеогенеза
- 5) в образовании лактата

### **СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ ПО РАЗДЕЛУ «ОБМЕН И ФУНКЦИИ УГЛЕВОДОВ»**

1. Студент готовился к экзамену и съел сразу 200 г сахара. Полезно ли это? Можно ли ожидать появление глюкозурии?
2. Через 30 мин. после приёма 100г сахара содержание глюкозы в крови у пациента повысилось в 1,5 раза, а после употребления 100г хлеба оно существенно не изменилось. Почему?
3. 7-летнему ребенку необходимо определить сахар крови для выявления сахарного диабета. Ребенок перед проведением пробы в лаборатории очень волновался, плакал. Установлено, что у ребенка уровень сахара в крови выше нормы. Можно ли утверждать после такого исследования, что у ребенка диабет?
4. Больному со склонностью к полноте рекомендовано ограничить употребление углеводов и заниматься физкультурой. Объясните почему?
5. Спортсмен пробежал стометровую дистанцию. Изменится ли содержание молочной кислоты в крови? Почему?
6. Один спортсмен пробежал на соревнованиях дистанцию 100 м, другой – 5000 метров. У которого из них содержание молочной кислоты в крови будет выше? Почему?
7. Выполняя рекомендации врача, пациент двое суток не получал углеводов, однако, значительного снижения уровня глюкозы в крови не наблюдалось. Какие механизмы стабилизируют уровень сахара в крови, имеют ли они важное значение для жизнедеятельности?
8. При обследовании у пациента в крови обнаружено 9,5 ммоль/л. Какие причины гипергликемии? Какие анализы целесообразно проводить для уточнения ее характера?
9. У пациента содержание глюкозы в крови 4,1 ммоль/л, в суточной моче 1% глюкозы. Причина глюкозурии?

10. Пациенту подкожно ввели раствор инсулина. Как и почему изменится содержание глюкозы в крови?
11. У грудного ребенка отмечена умственная отсталость, помутнение хрусталика. В крови и моче повышено содержание галактозы. О каком заболевании можно думать? Какую диету следует назначить ребенку?
12. В больницу поступил ребенок, у которого после употребления молока началась рвота. В чем причина?
13. У грудного ребенка часто появляются судороги, при обследовании отмечено увеличение размеров печени. В крови повышено содержание лактата и пирувата, гипогликемия. При введении адреналина содержание сахара в крови не возрастает, увеличивается количество молочной кислоты. О каком нарушении углеводного обмена следует думать?

## РАЗДЕЛ 10. ОБМЕН И ФУНКЦИИ ЛИПИДОВ

### ТЕМА 10.1. СТРОЕНИЕ И ВНЕШНИЙ ОБМЕН ЛИПИДОВ

#### *Актуальность*

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

#### *Цель*

Ознакомление с методами определения качества пищевого жира, активности липазы в панкреатическом соке и ролью желчных кислот в переваривании липидов.

#### *Вопросы для самоподготовки*

1. Какой класс органических веществ называется липидами? Назовите их биологическую роль.
2. Назовите классификацию липидов. Охарактеризуйте основные группы липидов (химическая структура, физико-химические свойства, биологическая роль).
3. Назовите жирные кислоты, их строение, классификацию, физико-химические свойства, источники жирных кислот в организме.
4. Назовите незаменимые факторы питания липидной природы, предшественники синтеза эйкозаноидов.
5. Назовите важнейшие липиды животного и растительного происхождения, их суточную потребность.
6. Охарактеризуйте внешний обмен липидов, роль ферментов и желчных кислот, химическое строение таурохолевой и гликохолевой кислот.
7. Охарактеризуйте ресинтез липидов в стенке кишечника, а также форму транспорта липидов из кишечника – хиломикроны. Укажите их строение и свойства.
8. Назовите нарушения внешнего обмена, причины и последствия (гиповитаминозы, стеаторея).

9. Назовите производные липидов, используемые в качестве лекарственных форм, содержащие ненасыщенные жирные кислоты, эйкозаноиды, фосфолипиды и др.

### Лабораторная работа 1

#### Исследование действия липазы поджелудочной железы.

#### Влияние желчи на активность липазы

##### Принцип

под действием фермента липазы эмульгированные жиры молока гидролизуются. Количество образовавшихся жирных кислот определяют при помощи титрования раствором щелочи в присутствии фенолфталеина.

*Материал исследования:* Панкреатин – источник липазы.

##### Реактивы

1) Молоко, 2) раствор желчи, 3) 0,1М раствор NaOH, 4) фенолфталеин.

##### Проведение анализа

	Контроль, мл	Опыт 1, мл	Опыт 2, мл
Молоко	1,0	1,0	1,0
Дистилл.вода	2,0	2,0	1,0
Панкреатин	–	1,0	1,0
Раствор желчи	–	–	1,0
Ставят на 15 мин на водяную баню при 38°C.			
Фенолфталеин	1-2 капли	1-2 капли	1-2 капли
Раствор NaOH	Титруют до слабо-розовой окраски, не исчезающей в течение 30 с		

Результаты титрования фиксируют следующим образом:

$V_K$  – количество мл щелочи, потраченной на титрование контрольной пробы – исходное количество органических кислот, в том числе и жирных:

$V_1$  – количество мл щелочи, потраченной на титрование опытной пробы 1;

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

##### Расчет

1) количество жирных кислот, образовавшихся при ферментативном гидролизе жира молока без желчи:

$$X_1 = V_1 - V_K$$

2) количество жирных кислот, образовавшихся при ферментативном гидролизе жира молока в присутствии желчи:

$$X_2 = V_2 - V_k$$

3) рассчитывают степень влияния желчи на активность липазы:

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

#### *Оформление работы*

Записывают принцип метода. Фиксируют результаты и делают вывод о влиянии желчи на переваривание жиров молока.

### Лабораторная работа 2 Качественная реакция на желчные кислоты (реакция Петтенкофера)

#### *Принцип*

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

*Материал исследования:* раствор желчи (2:1)

#### *Реактивы*

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

#### *Проведение анализа*

На сухое предметное стекло, под которое подложен лист бумаги, наносят 1 каплю желчи, 1 каплю раствора сахарозы и перемешивают стеклянной палочкой. Не двигая стекло, рядом наносят 3 капли серной кислоты. Через 2-3 мин на месте слияния капель наблюдается красная окраска, переходящая в красно-фиолетовую.

#### *Оформление работы*

Записывают принцип метода и фиксируют результаты.

### Лабораторная работа 3 Определение кислотного числа жира

#### *Принцип*

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

**Материал исследования**

Свежее и прогорклое растительное масло

**Реактивы**

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

**Проведение анализа**

	<b>Опыт 1, мл</b>	<b>Опыт 2, мл</b>
Свежее раст. масло	0,5	–
Прогорклое растит. масло	–	0,5
Хлороформ	0,5	0,5
Фенолфталеин	1-2 капли	1-2 капли
Раствор КОН	Титруют до светло-розового окрашивания, не исчезающего в течение минуты.	

**Расчет**

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

где а – количество раствора щелочи, израсходованное на титрование; 0,00561 – титр 0,1н раствора КОН; б – объём жира в мл (0,5 мл); 0,9 – плотность жира; 1000 – коэффициент перевода г в мг.

**Нормальные величины**

Свежее растительное масло 1-3 ед

**Практическое значение**

Метод предназначен для оценки качества жира, а также масляных основ, используемых в фармацевтической практике для приготовления мазей.

**Оформление работы**

Записывают принцип метода. Отмечают результаты для свежего и прогорклого растительного масла. Делают вывод об особенностях содержания жирных кислот и качестве жира.

## **ТЕМА 10.2. ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ ТРИАЦИЛГЛИЦЕРИНОВ**

**Актуальность**

Триацилглицерины (ТАГ) (нейтральные жиры) – сложные эфиры глицерина и высших жирных кислот. Знание особенностей обмена нейтральных жиров необходимо для понимания патогенеза

таких заболеваний, как ожирение, сахарный диабет, атеросклероз. Знакомство с методами определения в крови общих липидов и их фракции нейтральных жиров позволяет использовать эти сведения для диагностики заболеваний, связанных с нарушением липидного обмена.

### *Цель*

Научиться определять в сыворотке крови уровень общих липидов и триацилглицеринов для диагностики заболеваний.

### *Вопросы для самоподготовки*

1. Назовите основные пути внутриклеточного превращения триацилглицеринов. Укажите в виде схемы.
2. Какой процесс называется тканевым липолизом? Назовите роль гормончувствительной липазы и аденилатциклазной системы в регуляции ее активности.
3. Назовите пути использования глицерина. Напишите химизм окисления глицерина до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ . Укажите энергетический выход процесса.
4. Назовите пути использования свободных жирных кислот, образующихся при липолизе и мобилизующихся в кровь.
5. Какой процесс называется  $\beta$ -окислением? Напишите химизм окисления жирных кислот до углекислого газа и воды. Укажите связь с ЦТК и дыхательной цепью, а также энергетический выход процесса.
6. Назовите возможные пути использования ацетил-S-CoA. Напишите химизм синтеза кетоновых тел. Укажите причины кетоза при голодании и сахарном диабете.
7. Какой процесс называется липогенезом? Назовите пути эндогенного синтеза ТАГ, особенности биосинтеза жиров в жировой ткани и печени. Напишите химизм биосинтеза жира.
8. Отрадите схематично синтез ТАГ из глюкозы: синтез жирных кислот и глицерина из глюкозы; образование фосфатидной кислоты из жирных кислот и глицерина. Укажите регуляцию, значение процесса и зависимость от ритма питания.
9. Охарактеризуйте транспорт ТАГ: липопротеины очень низкой плотности, состав, строение, функция, утилизация. Назовите нарушения обмена ТАГ (ожирение, дислиппротеинемии).



## Лабораторная работа 1

**Количественное определение концентрации  
общих липидов в сыворотке сульфованилиновым методом**

Понятие "общие липиды" объединяет в себе сумму всех липидов, содержащихся в плазме или сыворотке крови.

*Принцип*

Для определения липидов сыворотки их предварительно гидролизуют концентрированной серной кислотой. Продукты распада липидов образуют с сульфованилиновым реактивом окрашенное в желтый цвет соединение, интенсивность окраски которого определяют колориметрически.

*Реактивы*

1) концентрированная  $H_2SO_4$ . 2) Фосфорно-ванилиновая смесь: концентрированную  $H_3PO_4$  смешивают с 0,6% раствором ванилина в соотношении 4:1. 3) Стандартный раствор: 0,6% раствор триолеина.

*Проведение анализа*

	<b>ОПЫТ, мл</b>	<b>СТАНДАРТ, мл</b>	<b>КОНТРОЛЬ, мл</b>
Сыворотка крови	0,05	–	–
Стандартный р-р липидов	–	0,05	–
Дистилл. вода	–	–	0,05
Серная кислота	2,5	2,5	2,5
	Нагревают 10 мин на кипящей водяной бане. Отбирают по 0,2 мл из всех пробирок и переносят, соответственно, в следующие три пробирки.		
Фосфорнованилиновая смесь	3,0	3,0	3,0
	Выдерживают 45 мин при комнатной температуре в темноте. Колориметрируют против контроля при длине волны 500-560 нм в кювете 0,5 см.		

*Расчет*

$$[\text{Общие липиды, г/л}] = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}}$$

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

*Нормальные величины*

Сыворотка                                  4,0 - 8,0 г/л

*Практическое значение*

Содержание общих липидов в крови повышается (гиперлипемия) при ожирении, атеросклерозе, часто у больных ишемической болезнью сердца и сахарным диабетом, заболеваниях почек (липоидный нефроз), а также при гипотиреозе, панкреатите, алкоголизме, при поражении печени (цирроз, острый гепатит).

*Оформление работы*

Записывают принцип метода и отмечают результаты. Делают вывод об особенностях состояния больного.

Более информативным для диагностики является определение липидных фракций: триацилглицеринов, холестерина, фосфолипидов, липопротеинов.

**ТЕМА 10.3. ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ОБМЕН СЛОЖНЫХ ЛИПИДОВ***Актуальность*

Фосфолипиды и холестерин образуют клеточные мембраны, находятся в составе липопротеинов. При нарушении синтеза фосфолипидов будет нарушаться нормальный метаболизм клеток, образование транспортных липопротеинов, что ведет к многочисленным нарушениям деятельности органов. Нарушения обмена холестерина проявляются такими распространенными заболеваниями как атеросклероз и желчекаменная болезнь.

*Цель*

Освоить методы определения в сыворотке крови общего холестерина, холестерина ЛПВП, индекса атерогенности; методы определения кетоновых тел в моче.

*Вопросы для самоподготовки*

1. Напишите строение, укажите биологическую роль фосфолипидов. Охарактеризуйте катаболизм фосфолипидов и его значение.
2. Назовите роль фосфатидной кислоты в синтезе триацилглицеринов и глицерофосфолипидов.
3. Напишите химизм биосинтеза фосфолипидов в тканях. Назовите липотропные факторы, роль аминокислот, витаминов.
4. Назовите причины жирового перерождения печени, липотропные вещества как лекарственные средства.
5. Напишите химическое строение и назовите биологическую роль холестерина.
6. Назовите особенности транспорта экзогенного и эндогенного холестерина в организме. Назовите формы транспорта.

7. Напишите химизм синтеза эндогенного холестерина до мевалоновой кислоты, представление о дальнейших этапах.
8. Назовите роль транспортных липопротеинов в обмене холестерина и пути выведения холестерина из организма.
9. Охарактеризуйте нарушения обмена холестерина (гиперлиппротеинемия, атеросклероз, желчекаменная болезнь).

Лабораторная работа 1  
**Обнаружение фосфатидилхолина (лецитина)  
в яичном желтке**

*Принцип*

Метод основан на гидролизе лецитинов желтка в растворе NaOH и последующего определения в гидролизате их структурных компонентов: жирных кислот, глицерина, холина, фосфорной кислоты.

*Материал исследования:* сухой желток куриного яйца.

*Реактивы*

1) 10% раствор NaOH, 2) 10% раствор HCl, 3) концентрированная HNO<sub>3</sub>, 4) молибденовый реактив, 5) 1% раствор CuSO<sub>4</sub>.

*Проведение анализа*

Гидролиз лецитина. Кусочек желтка помещают в пробирку и прибавляют 1-2 мл 10% раствора NaOH, кипятят в водяной бане 15 минут.

Открытие холина. Холин при нагревании в щелочной среде превращается в триметиламин N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, который обнаруживается в конце гидролиза по запаху селедочного рассола.

Гидролизат желтка делят на 3 пробирки:

Открытие жирных кислот. К гидролизату первой пробирки прибавляют по каплям 10% соляную кислоту до появления хлопьевидной взвеси жирных кислот.

Открытие фосфорной кислоты. Ко второй части гидролизата осторожно добавляют 5-7 капель концентрированной азотной кислоты и по каплям молибденовый реактив до появления желтого осадка фосфомолибдата аммония.

Обнаружение глицерина. К третьей части гидролизата добавляют 5 капель 10% раствора NaOH и 1 каплю раствора CuSO<sub>4</sub>, перемешивают, образуется хелатное соединение меди с глицерином ярко-синего цвета.

*Оформление работы*

Записывают результат реакций в виде таблицы:

Продукты гидролиза лецитина (формулы)	Качественная реакция	Окраска	Чем обусловлена реакция

## Лабораторная работа 2

### Определение общего холестерина в сыворотке крови ферментативным методом

*Принцип*

Основан на использовании сопряженных ферментативных реакций, катализируемых холестеролэстеразой, осуществляющей гидролиз эфиров холестерина до свободной формы; холестеролоксидазой, превращающей холестерин в холестенон с образованием  $H_2O_2$ ; пероксидазой, катализирующей в присутствии фенола окисление пероксидом водорода 4-аминоантипирина с образованием продуктов розово-малинового цвета.

*Реактивы*

1) рабочий реактив: раствор холестеролэстеразы (200 Е/л), холестеролоксидазы (100 Е/л), пероксидазы (80 Е/л), фенола (6,0 мМ), 4-аминоантипирина (0,5 мМ) в 0,1 М калиево-фосфорном буфере. 2) стандартный раствор холестерина, 4,65 ммоль/л.

*Материал исследования:* сыворотка крови

*Проведение анализа*

	ОПЫТ, мл	СТАНДАРТ, мл	КОНТРОЛЬ, мл
Дист. вода	–	–	0,02
Сыворотка	0,02	–	–
Стандарт	–	0,02	–
Рабочий реактив	2,0	2,0	2,0
Инкубируют 20 мин при 37°C, измеряют оптическую плотность опыта и стандарта против контроля при 500 нм (зеленый светофильтр).			

*Расчет*

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

*Нормальные величины*

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

*Практическое значение*

Гиперхолестеринемия приводит к раннему развитию атеросклероза и его клинических осложнений – ишемической болезни сердца, инсульта. К нарушениям обмена холестерина относится желчекаменная болезнь.

Высокое содержание холестерина в крови наблюдается при гиперлипидемиях II<sup>a</sup> и II<sup>b</sup>, IV типов, нефротическом синдроме, диабете. Гипохолестеринемия – при гипопропротеинемии, циррозе печени, злокачественных опухолях.

*Оформление работы*

Записывают принцип методов, результаты колориметрии, расчет и результаты анализа. Делают вывод о практическом значении метода и о возможной патологии пациента.

## Лабораторная работа 3

**Определение в сыворотке крови холестерина ЛПВП, холестерина ЛПНП+ЛПОНП, индекса атерогенности***Принцип*

Метод основан на осаждении липопротеинов низкой плотности и липопротеинов очень низкой плотности магния хлоридом и определении содержания общего холестерина в исходной сыворотке и холестерина в ЛПВП в надосадочной жидкости после осаждения других форм фракций липопротеинов. Полученные результаты используют для расчета холестерина в ЛПНП+ЛПОНП, а также индекса атерогенности.

*Материал исследования: сыворотка крови*

*Реактивы*

- 1) 0,5М раствор  $MgCl_2$  в 4% фосфорновольфрамовой кислоте,
- 2) набор реактивов "Био-ла-тест" для определения холестерина.

*Проведение анализа*

К 1,0 мл сыворотки крови прибавить 0,1 мл раствора  $MgCl_2$ . Для осаждения ЛПНП и ЛПОНП инкубируют пробу в ледяной бане в течение 30 мин. Центрифугируют в течение 15 мин при 3000 об/мин, надосадочную жидкость переносят в другую пробирку, закрывают пробкой. Определяют концентрацию холестерина набором

реактивов "Био-ла-тест": в 1-ю пробирку вносят 0,05 мл сыворотки крови для определения общего холестерина, во 2-ю пробирку – 0,05 мл надосадочной жидкости для определения холестерина в ЛПВП, 3-ю и 4-ю пробирки используют как стандартную и контрольную. Далее определение проводят как указано в предыдущей работе.

Рассчитывают содержание общего холестерина и холестерина в ЛПВП.

Содержание холестерина в ЛПНП и ЛПОНП рассчитывают по формуле:

$$\{ХС_{\text{ЛПНП+ЛПОНП}}\} = ХС_{\text{ОБЩИЙ}} - ХС_{\text{ЛПВП}}$$

Риск развития атеросклероза прогнозируется индексом атерогенности. Его рассчитывают по формуле:

$$\text{Индекс атерогенности} = (ХС_{\text{ОБЩИЙ}} - ХС_{\text{ЛПВП}}) : ХС_{\text{ЛПВП}}$$

#### *Нормальные величины*

Сыворотка крови

Холестерин ЛПВП 0,9-1,9 ммоль/л

Индекс атерогенности

20 -30 лет 2.0-2.8

больше 30 лет 3.0-3.5

#### *Практическое значение*

Увеличение концентрации холестерина ЛПВП клинически не значимо, наблюдается при доброкачественных состояниях. Снижение содержания холестерина ЛПВП свидетельствует об угрозе атеросклероза.

Увеличение индекса атерогенности до 4 и более наблюдается при ишемической болезни сердца и атеросклерозе.

#### *Оформление работы*

Отмечают принцип метода, записывают результаты и делают вывод о практическом значении работы и возможных нарушениях.

### Лабораторная работа 4

#### **Определение кетоновых тел и глюкозы в моче**

#### *Материал исследования*

Моча нормальная и с добавлением ацетона.

#### *Реактивы*

1) 10% свежеприготовленный раствор нитропруссиды натрия, 2) 10% раствор NaOH, 3) раствор Люголя, 4) 5% раствор FeCl<sub>3</sub>,

5) концентрированная уксусная кислота, 6) диагностические полоски "Диафан", "Кетофан".

*А. ПРОБА ЛЕГАЛЯ НА АЦЕТОН И АЦЕТОУКСУСНУЮ  
КИСЛОТУ*

*Принцип*

Метод основан на способности ацетона и ацетоуксусной кислоты в щелочной среде образовывать с нитропруссидом натрия комплексы оранжево-красного цвета, превращающиеся при подкислении раствора в соединения вишнево-красного цвета. Проба более чувствительна к ацетоуксусной кислоте, чем к ацетону, с  $\beta$ -гидроксимасляной кислотой реакция не идет.

*Проведение анализа:*

В две пробирки вносят по 10 капель патологической и нормальной мочи. В обе пробирки добавляют по 2 капли нитропруссид натрия и по 4 капли раствора NaOH, появляется оранжево-красное окрашивание. Вносят в обе пробирки по 10 капель концентрированной уксусной кислоты. При наличии ацетоновых тел появляется вишнево-красное окрашивание. Если ацетон отсутствует, то при подкислении окрашивание переходит в желтое.

*Б. ПРОБА ЛИБЕНА НА АЦЕТОН*

*Принцип*

Метод основан на способности ацетона в щелочной среде образовывать желтый осадок йодоформа, обладающего специфическим запахом.

*Проведение анализа*

В две пробирки вносят по 1 мл патологической и нормальной мочи. В обе пробирки добавляют по 2 капли раствора NaOH и затем раствор Люголя до слабо-желтой окраски раствора. При наличии ацетона жидкость мутнеет вследствие выделения бледно-желтого осадка йодоформа, обладающего характерным запахом.

*ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЕТОНОВЫХ ТЕЛ И ГЛЮКОЗЫ С  
ПОМОЩЬЮ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПОЛОСОК "ДИАФАН"*

*Принцип*

Определение кетоновых тел основано на реакции Легалья. Определение глюкозы основано на ферментативной глюкозооксидазной реакции.

### *Проведение анализа*

Полоски берут из пенала упаковки, не прикасаясь руками к зонам индикации. Опускают полоску на 1-2 секунды в исследуемую мочу, лишнюю жидкость удаляют, проводя полоской по краю сосуда. Полоски оставляют в горизонтальном положении и через 60 секунд сопоставляют окраску зон индикации с соответствующей цветной шкалой для кетоновых тел и глюкозы.

### *ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЕТОНОВЫХ ТЕЛ В МОЧЕ И СЫВОРОТКЕ КРОВИ С ПОМОЩЬЮ ПОЛОСОК "КЕТОФАН"*

#### *Принцип*

Желтая полоска (зона индикации) на индикаторной бумаге содержит щелочной буфер в смеси с нитропруссидом натрия, дающий с ацетоном и ацетоуксусной кислотой фиолетовое окрашивание. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации кетоновых тел в исследуемой жидкости.

#### *Проведение анализа*

Полоски берут из пенала упаковки, не прикасаясь руками к зонам индикации. Опускают полоску на 1-2 секунды в исследуемую жидкость, лишнюю жидкость удаляют, проводя полоской по краю сосуда и через 1 минуту сравнивают со шкалой, находящейся на этикетке упаковки. Концентрацию кетоновых тел определяют по таблице:

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

#### *Нормальные величины*

Сыворотка крови                    0,1-0,6 ммоль/л

Моча                                    отсутствие

#### *Практическое значение*

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



*Оформление работы*

Отчет составляется в виде таблицы, в графе результаты отображается получаемая окраска, присутствие (+) или отсутствие (–) кетоновых тел и глюкозы.

	<b>Метод</b>	<b>Объект исследования</b>	<b>Выявляемое вещество</b>	<b>Реактивы</b>	<b>Результат</b>
1	Проба Легаля	Моча норм. Моча патол.			
2	Проба Либена	Моча норм. Моча патол.			
3	Полоски "Диафан"	Моча норм. Моча патол.			
4	Полоски "Кетофан"	Сыворотка Моча норм. Моча патол.			

**ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ПО РАЗДЕЛУ  
«ОБМЕН И ФУНКЦИИ ЛИПИДОВ»**

13. ЛИНОЛЕВАЯ И ЛИНОЛЕНОВАЯ КИСЛОТЫ ВХОДЯТ В СОСТАВ НЕЙТРАЛЬНЫХ ЖИРОВ (ТРИАЦИЛГЛИЦЕРИНОВ):

- 1) пальмового масла
- 2) льняного масла
- 3) подсолнечного масла
- 4) сливочного масла
- 5) свиного сала

14. ПО ХИМИЧЕСКОМУ СТРОЕНИЮ ФОСФОЛИПИДАМИ ЯВЛЯЮТСЯ:

- 1) кефалины
- 2) лецитин
- 3) фосфотидилсерин
- 4) спермацет
- 5) ланолин

15. ПО ХИМИЧЕСКОМУ СТРОЕНИЮ СТЕРОИДАМИ ЯВЛЯЮТСЯ:

- 1) желчные кислоты
- 2) гормоны надпочечников
- 3) ганглиозиды
- 4) половые гормоны
- 5) сфингомиелины

16. СТЕРОИДНУЮ ПРИРОДУ СТРОЕНИЯ ИМЕЕТ:
- 1) витамин С
  - 2) витамин К
  - 3) витамин А
  - 4) витамин Е
  - 5) витамин Д
17. ПО ХИМИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЕ ПРОСТАГЛАНДИНЫ ЯВЛЯЮТСЯ ПРОИЗВОДНЫМИ:
- 1) циклопентанпергидрофенантрена
  - 2) трехатомного спирта глицерина
  - 3) полиненасыщенной жирной кислоты
18. СВОБОДНЫЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ ОБРАЗУЮТСЯ В РЕЗУЛЬТАТЕ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТА:
- 1) фосфолипазы
  - 2) ацетилхолинэстеразы
  - 3) неспецифических эстераз
  - 4) липаз
19. ОСНОВНОЙ ПРИЧИНОЙ НАРУШЕНИЯ ПЕРЕВАРИВАНИЯ И ВСАСЫВАНИЯ ЖИРОВ ЯВЛЯЕТСЯ:
- 1) нарушение синтеза панкреатической липазы
  - 2) отсутствие секреции трипсина
  - 3) нарушение поступления желчи в кишечник
  - 4) затруднение поступления панкреатического сока в кишечник.
20. ЭМУЛЬГАТОРАМИ ЖИРОВ В ОРГАНИЗМЕ ЧЕЛОВЕКА ЯВЛЯЮТСЯ:
- 1) желчные кислоты
  - 2) моноацилглицеролы
  - 3) холин
  - 4) креатин
21. ПЕРЕНОС ОСТАТКА ЖИРНОЙ КИСЛОТЫ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ МИТОХОНДРИЙ ОСУЩЕСТВЛЯЕТ:
- 1) карнозин
  - 2) карнитин
  - 3) креатинин
  - 4) анзерин
22. В РЕЗУЛЬТАТЕ В-ОКИСЛЕНИЯ СТЕАРИНОВОЙ КИСЛОТЫ ОБРАЗУЕТСЯ АЦЕТИЛ-КОА В КОЛИЧЕСТВЕ:
- 1) 8 молекул
  - 2) 3 молекулы

- 3) 9 молекул
  - 4) 10 молекул
  - 5) 7 молекул
23. ОСНОВНОЕ КОЛИЧЕСТВО АЦЕТИЛ-КОА В МИТОХОНДРИЯХ ОБРАЗУЕТСЯ В РЕЗУЛЬТАТЕ ПРОЦЕССОВ:
- 1) окислительное декарбоксилирование пирувата
  - 2)  $\beta$ -окисление ЖК
  - 3) ацетил-КоА-карбоксилазная реакция
24. В СИНТЕЗЕ ВЫСШИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В КАЧЕСТВЕ ИСТОЧНИКА ВОДОРОДА ИСПОЛЬЗУЕТСЯ:
- 1) НАДН
  - 2) НАДФН
  - 3) ФАДН<sub>2</sub>
  - 4) аскорбиновая кислота
25. АЦЕТИЛ-КОА ЯВЛЯЕТСЯ СУБСТРАТОМ ДЛЯ СИНТЕЗА:
- 1) глицерола
  - 2) жирных кислот
  - 3) стероидов
  - 4) кетоновых тел
  - 5) инозита
26. МЕСТОМ ОБРАЗОВАНИЯ ЛИПОПРОТЕИНОВ ОЧЕНЬ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ (ЛПОНП) ЯВЛЯЕТСЯ:
- 1) кишечник
  - 2) кровь
  - 3) печень
27. ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ГОЛОДАНИИ АКТИВИРУЮТСЯ ПРОЦЕССЫ:
- 1) липолиз в жировой ткани
  - 2)  $\beta$ -окисление в печени
  - 3) синтез кетоновых тел в печени
  - 4) липогенез в жировой ткани
28. АНТИАТЕРОГЕННОЙ АКТИВНОСТЬЮ ОБЛАДАЕТ:
- 1) ХМ
  - 2) ЛПНП
  - 3) ЛПОНП
  - 4) ЛПВП

## СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ ПО РАЗДЕЛУ «ОБМЕН И ФУНКЦИИ ЛИПИДОВ»

1. В результате хранения сливочного масла вкус его ухудшился. Какие процессы обуславливают прогоркание масла? Какими количественными методами анализа можно оценить качество жира?
2. У грудного ребенка в желудочном соке обнаружена высокоактивная липаза, тогда как у взрослого пациента ее не нашли. Являются ли эти данные патологическими (отклоняющимися от нормы)?
3. У больного при зондировании двенадцатиперстной кишки установлена задержка оттока желчи из желчного пузыря. Влияет ли это на переваривание жиров?
4. У больного обнаружено большое количество жира в кале (стеаторея). Назовите основные причины нарушения переваривания и всасывания жира.
5. Через 5 часов после обеда провели исследование крови. Обнаружили повышение содержания липидов. Какие липиды преобладали, в какой форме?
6. У пациента установлена недостаточность активности липопротеинлипазы, которая гидролизует триацилглицерины хиломикрон на поверхности эпителия капилляров жировой ткани. Какие биохимические нарушения у него могут наблюдаться?
7. Человека укусила змея. При анализе крови обнаружен гемолиз эритроцитов. Объясните причину гемолиза.
8. У спортсмена перед ответственным стартом в крови повысилось содержание глюкозы до 6,5 ммоль/л и уровень свободных жирных кислот до 1,2 ммоль/л при норме 0,4-0,9 ммоль/л. Причина изменений?
9. У больного с мочой выделяются кетоновые тела. Как называется это явление, его основные причины, главные пути образования кетоновых тел?
10. Больной сахарным диабетом внезапно потерял сознание. Может ли врач установить характер диабетической комы без лабораторного подтверждения?
11. У больного обнаружена жировая дистрофия печени. Какую диету следует рекомендовать?

12. Пациенту с избыточным весом в результате ожирения врач рекомендовал диету с малым количеством углеводов. Почему?
13. Больной атеросклерозом поступил в клинику для обследования. Есть ли смысл определять изменения в спектре липопротеинов крови? На что следует обратить особое внимание в показателях липидного обмена?
14. Почему больному атеросклерозом врач при выписке из больницы рекомендовал сбалансировать диету, увеличить количество овощей.
15. У пациента в крови отмечено увеличение липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) при нормальном содержании липопротеинов низкой плотности (ЛПНП). Определите тип гиперлиппротеинемии. При какой патологии встречается?

## РАЗДЕЛ 11. ОБМЕН БЕЛКОВ

### ТЕМА 11.1. ПЕРЕВАРИВАНИЕ ПРОСТЫХ БЕЛКОВ В ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОМ ТРАКТЕ

#### *Актуальность*

Пищевые продукты животного и растительного происхождения являются главными источниками белков для человека. В желудочно-кишечном тракте идет последовательное расщепление белков до аминокислот. Протеолитические ферменты (класс гидролаз) обладают относительно широкой специфичностью. Пепсин желудочного сока устойчив в сильноокислой среде, условия для активации и действия пепсина создаются в желудке за счет соляной кислоты, рН чистого желудочного сока – 1,0-2,0. Поэтому методы анализа состава желудочного сока имеют большое значение для оценки переваривающей способности желудочного сока в норме и при патологии.

#### *Цель*

Освоение методов качественного и количественного анализа желудочного сока для исследования секреторной функции желудка здорового организма и возможных отклонений при патологии.

#### *Вопросы для самоподготовки*

1. Назовите роль белков в организме.
2. Назовите понятие «азотистый баланс» и возможные его изменения (равновесие, положительный и отрицательный азотистый баланс).
3. Назовите нормы белка в питании, критерии биологической ценности белков.
4. Охарактеризуйте процесс переваривания белков. Назовите протеолитические ферменты желудочно-кишечного тракта.
5. Назовите механизмы активации основных ферментов, место их образования (пепсин, трипсин, химотрипсин).
6. Охарактеризуйте переваривание белков в желудке. Назовите роль соляной кислоты.
7. Какой процесс называется гниением белков? Напишите примеры превращений аминокислот под действием микрофлоры кишечника (реакции образования крезола, скатола, индола).
8. Где происходит процесс обезвреживания токсичных продуктов? Укажите строение ферментов, напишите структуру их коферментов. Приведите примеры реакций обезвреживания.

## Лабораторная работа 1

### Определение свободной соляной кислоты в желудочном соке

Отклонения в составе пищеварительных соков или появление в них компонентов, не содержащихся в физиологических условиях, дают важную информацию о патологии пищеварения. В клинической практике используют методы анализа желудочного сока для диагностики и лечения заболеваний.

При анализе желудочного сока определяют его общее количество, цвет, запах, наличие слизи, общую кислотность, количество свободной и связанной соляной кислоты, присутствие молочной кислоты, крови и желчных пигментов.

#### *А. ПРИ ПОМОЩИ ИНДИКАТОРА «КОНГО КРАСНЫЙ»*

##### *Принцип*

В присутствии свободной соляной кислоты в желудочном соке индикатор «конго красный» меняет окраску на синюю, оставаясь в нейтральной и щелочной среде красным (зона перехода рН 3,0-5,2).

Реактивы индикаторная бумага «конго красный»

##### *Материал исследования*

Нормальный и патологический желудочный сок.

##### *Проведение анализа*

На две разные полоски индикаторной бумаги наносят стеклянной палочкой по 1 капле нормального и патологического желудочного сока.

#### *Б. ПРИ ПОМОЩИ ИНДИКАТОРА ДИМЕТИЛАМИНОАЗОБЕНЗОЛА*

##### *Принцип*

Индикатор, п-диметиламиноазобензол, в присутствии свободной соляной кислоты, имеет красную окраску, в щелочной среде – желтую (зона перехода рН 2,3-4,2).

##### *Реактивы*

Индикатор п-диметиламиноазобензол.

##### *Материал исследования*

Нормальный и патологический желудочный сок.

##### *Проведение анализа*

В две пробирки вносят по 10 капель исследуемого желудочного сока, добавляют по 2 капли п-диметиламиноазобензола.

##### *Оформление работы*

Отмечают принцип методов, регистрируют результаты в таблице.

Образец желудочного сока	Изменение окраски индикатора		Величина рН
	Конго красный	п-Диметиламино- азобензол	
Нормальный			
Патологический			

#### *Практическое значение*

Желудочный сок, представляющий собой бесцветную жидкость с рН 1,5-1,8, вырабатывается в количестве 2-3л в сутки железами, локализованными в слизистой оболочке желудка. Особенностью желудочного сока, с которой связаны как его переваривающие функции, так и агрессивные свойства, является наличие кислых протеаз и соляной кислоты. Свободная соляная кислота способствует превращению пепсиногена в пепсин, денатурации пищевых белков, оказывает бактерицидное действие, создает оптимальную рН среды для воздействия пепсина, стимулирует выработку секретина, ускоряет всасывание ионов железа. При воспалительных процессах в желудке имеет место нарушение секреции соляной кислоты и, соответственно, переваривания белков. Поэтому, в медицинской практике с лечебной целью используют средства, влияющие на секреторную функцию желудка. Например, к средствам заместительной терапии стимулирующим секрецию желудочного сока относятся: пентагастрин (синтетический фрагмент гастрина); желудочный сок натуральный (содержит все ферменты желудочного сока); пепсин (протеолитический фермент), применяемый в сочетании с разведенной хлористоводородной кислотой; кислота хлористоводородная (разведенная); ацидин - пепсин (бетацид, аципепсол, пепсамин); пепсидил (продукт гидролиза слизистой оболочки желудка с ферментами желудочного сока, растворенными в хлористоводородной кислоте); абомин (содержит сумму протеолитических ферментов).

Показанием к применению этой группы препаратов являются заболевания с нарушением переваривающей способности и снижением секреции (гипо- и анацидные гастриты, энтероколиты и др.).

При гастритах назначают также ферментативные препараты, улучшающие процессы пищеварения (панзинорм, фестал и др.).



## Лабораторная работа 2

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

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

#### *Принцип*

Метод основан на определении кислотных веществ желудочного сока путем титрования их раствором NaOH в присутствии двух индикаторов – диметиламиноазобензола (интервал перехода pH 2,3-4,2) и фенолфталеина (зона перехода pH 8,2-10,0). По изменению окраски от красной к оранжевой индикатора диметиламиноазобензола определяется свободная кислота, а по переходу окраски фенолфталеина (от бесцветной к розовой) – общая кислотность желудочного сока.

#### *Реактивы*

1) 0,1н NaOH, 2) 1% спиртовой раствор фенолфталеина, 3) 0,5% спиртовой раствор п-диметиламиноазобензола.

#### *Материал исследования*

Нормальный желудочный сок, образцы желудочного сока N 1,2,3.

#### *Проведение анализа*

В коническую колбу помещают 5 мл исследуемого желудочного сока, добавляют по 2 капли диметиламиноазобензола и фенолфталеина. В присутствии свободной HCl наблюдается красное окрашивание, в отсутствие кислоты – желтое.

Титруют 0,1н раствором NaOH до появления оранжево-красной окраски и отмечают объем щелочи (мл), пошедшей на титрование свободной HCl – 1 пункт титрования.

Продолжают титрование до появления лимонно-желтой окраски и снова отмечают объем щелочи, израсходованной с начала титрования – 2 пункт титрования.

Затем титрование продолжают до появления розовой окраски и отмечают количество щелочи, пошедшее на все титрование – 3 пункт титрования.

#### *Расчет*

За единицу кислотности желудочного сока принимается: объем 0,1н NaOH (мл), необходимого для нейтрализации кислых эквивалентов в 100 мл желудочного сока (титрационные единицы, ТЕ) или количество миллимолей соляной кислоты в 1 л желудочного секрета. Численно эти величины совпадают (например, 40 ТЕ = 40 ммоль/л).

#### *Пример расчета*

На титрование 5 мл желудочного сока до первой отметки израсходовано 2,0 мл NaOH, до второй – 2,22 мл, до третьей – 3,18 мл (все отсчеты делаются от нулевой отметки). Тогда

а) содержание свободной HCl будет равно:

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

б) содержание общей HCl рассчитывается как среднее арифметическое между вторым и третьим пунктом титрования:

$$(2,22 + 3,18) : 2 \times (100 : 5) = 54 \text{ ммоль/л;}$$

в) содержание связанной HCl составит

$$54 - 40 = 14 \text{ ммоль/л}$$

г) общая кислотность будет равной

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

#### *Нормальные величины*

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

### Оформление работы

Отмечают принцип метода, регистрируют результаты анализа и делают вывод о наличии кислоты в исследуемом материале.

Образец желудочного сока	Количество 0,1н NaOH, израсходованное на титрование, мл			Соляная кислота, моль/л			Общая кислот- ность
	1 пункт	2 пункт	3 пункт	своб.	обща я	связ.	
Нормальный 1 2 3							

### Практическое значение

Определение кислотности желудочного сока имеет важное значение для диагностики некоторых заболеваний желудка. При патологии кислотность может быть нулевой, повышенной или пониженной.

Пониженная кислотность (гипохлоргидрия) встречается при гипоацидном гастрите, иногда при язвенной болезни желудка. Ахлоргидрия (полное отсутствие соляной кислоты) и значительное снижение общей кислотности отмечается при хроническом гастрите и раке желудка. Отсутствие соляной кислоты и пепсина (ахилия) часто связаны со злокачественными новообразованиями желудка, либо со злокачественным малокровием. Ахлоргидрия сопровождается появлением в желудке продуктов брожения – молочной, масляной, уксусной кислот, так как под влиянием микроорганизмов в желудке развиваются процессы брожения.

Увеличение содержания свободной HCl и общей кислотности (гиперхлоргидрия) имеет место при гиперацидном гастрите и часто сопровождается язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки. При этих состояниях применяют антацидные средства, угнетающие секрецию желудочного сока и нейтрализующие повышенную кислотность. К ним относят: магнезия окись (оказывает легкое слабительное и желчегонное действие); фосфалюгель (состав: гель алюминия фосфата, гель пептина и агар-агара); альмагель-А (по составу напоминает фосфалюгель, но дополнительно содержит анестезин для местноанестезирующего эффекта); гелусил-лак; нео-интестопан; гастал; кальмагин; сукральфат; мизопростол; даларгин (препарат пептидной структуры, снижает кислотность желудочного сока, способствует заживлению

язв желудка и двенадцатиперстной кишки); лоперамид (имодиум); омепразол (угнетает продукцию соляной кислоты в желудке) и др.

### Лабораторная работа 3 Обнаружение молочной кислоты в желудочном соке (реакция Уффельмана)

#### *Принцип*

Молочная кислота превращает фенолят железа (III) фиолетового цвета в малодиссоциирующую соль лактата железа желто-зеленого цвета.

#### *Реактивы*

1) 1% раствор фенола, 2) 1% раствор  $FeCl_3$ , 3) 40% молочная кислота.

#### *Материал исследования*

Нормальный и патологический желудочный сок.

#### *Проведение анализа*

Готовят раствор фенолята железа (III), смешивая 2,0 мл раствора фенола с 3 каплями раствора  $FeCl_3$ .

Разливают смесь в 3 пробирки:

в первую – по каплям вносят раствор молочной кислоты,

во вторую – нормальный желудочный сок,

в третью – патологический желудочный сок.

При наличии молочной кислоты фиолетовая окраска заменяется желто-зеленой, при ее отсутствии жидкость обесцвечивается.

#### *Оформление работы*

Отмечают принцип метода, регистрируют результаты анализа и делают вывод

<b>Образец желудочного сока</b>	<b>Наличие молочной кислоты</b>
Нормальный	
Патологический	

#### *Практическое значение*

Появление в желудке продуктов брожения – молочной, масляной, уксусной кислот – свидетельствует о появлении микроорганизмов в желудке и развитии процессов брожения. Одной из причин появления микроорганизмов в желудке является снижение бактерицидной активности соляной кислоты, либо развитие патогенной микрофлоры в кишечнике. Поэтому важное место занимают средства, нормализующие кишечную микрофлору, к ним относят: бифидумбактерин; бификол; гастрофарм;

бактисубтил; лактобактерин. Их применяют при кишечном дисбактериозе, кишечных инфекциях, колитах и энтероколитах.

#### Лабораторная работа 4 **Обнаружение кровяных пигментов в желудочном соке**

##### *А. РЕАКЦИЯ НА КРОВЬ С БЕНЗИДИНОМ.*

###### *Принцип*

Реакция основана на окислении бензидина атомарным кислородом, образующимся при разложении пероксида водорода под действием гемоглобина крови.

###### *Реактивы*

1) 1% перекись водорода, 2) 0,2% спиртовой раствор бензидина.

###### *Материал исследования*

Нормальный и патологический желудочный сок.

###### *Проведение анализа*

К 20 каплям нормального и патологического желудочного сока добавляют по 5 капель раствора бензидина и по 5 капель  $H_2O_2$ . При наличии крови в желудочном соке при стоянии наблюдается синее окрашивание.

##### *Б. ОБНАРУЖЕНИЕ КРОВИ С ПОМОЩЬЮ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПОЛОСОК "ГЕМОФАН"*

###### *Принцип*

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

###### *Материал исследования*

Нормальный и патологический желудочный сок.

###### *Проведение анализа*

В каждый образец исследуемого желудочного сока погружают индикационную зону диагностической полоски, быстро вынимают и через 30 с сравнивают с цветной шкалой на этикетке. По шкале сравнения определяют концентрации гемоглобина и эритроцитов.

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

### *Оформление работы*

Отмечают принцип методов, регистрируют результаты анализа и делают вывод о наличии крови.

### *Практическое значение*

Кровь (кровяные пигменты) может попадать в сок при изъязвлении стенок желудка. Желчные пигменты забрасываются в желудок из двенадцатиперстной кишки вследствие антиперистальтики.

## Лабораторная работа 5

### **Беззондовый метод определения кислотности желудочного сока (ацидотест)**

#### *Принцип*

Введенный в желудок пер ос краситель (2,4-диамино-4-этоксизобензол) освобождается из драже под действием свободной соляной кислоты ( $\text{pH} < 3,0$ ). Через 1,5 часа краситель появляется в моче. При подкислении мочи кислотой (25% раствор HCl) образуется солянокислая соль красителя красного цвета. Сопоставление окраски с приложенной шкалой служит показателем кислотности желудочного сока.

#### *Реактивы*

1) 25% соляная кислота, 2) драже красителя 2,4-диамино-4-этоксизобензола, 3) таблетки кофеинбензоата натрия.

#### *Материал исследования*

«Контрольная» порция мочи и собранная через 1,5 часа после приема красителя.

#### *Проведение анализа*

Подготовка пациента: после голодания в течение 8 часов и опорожнения мочевого пузыря пациент принимает кофеинбензоат натрия (в 100 мл воды), стимулирующего желудочную секрецию и диурез.

Через 1 час собирают «контрольную» мочу. Пациент, не разжевывая, проглатывает драже красителя и через 1,5 часа собирает мочу.

Анализ проводят одновременно с обеими порциями мочи: доводят водой до 200 мл, отбирают по 5 мл разбавленной мочи, добавляют по 5 мл 25% HCl и сравнивают со шкалой.

Метод удобен, надежен, щадит больного, рекомендуется при противопоказаниях к фракционному зондированию (гипертоническая болезнь, невропатии).

#### *Оформление работы*

Отмечают принцип метода.

## **ТЕМА 11.2. ОСНОВНЫЕ ПУТИ МЕТАБОЛИЗМА АМИНОКИСЛОТ В КЛЕТКЕ**

### *Актуальность*

Обмен белков выполняет ряд уникальных функций, свойственных живой материи, поддерживая в значительной мере динамичное состояние между организмом и внешней средой. Ежедневно в организме распадается до аминокислот почти 400 г белков и столько же синтезируется. Свыше 20 природных аминокислот, часть из которых являются незаменимыми, включаются в различные реакции, имеющие общие и специфические пути превращения, что объясняет разнообразие и разветвленность метаболизма аминокислот. Из аминокислот синтезируется большое количество биологически активных молекул. В медицине описаны многочисленные случаи нарушения различных этапов обменных реакций аминокислотного метаболизма.

### *Цель*

Научиться определять активность аминотрансфераз в сыворотке крови.

### *Вопросы для самоподготовки:*

1. Назовите основные пути восполнения аминокислотного фонда в клетках.
2. Назовите системы транспорта аминокислот через клеточные мембраны.
3. Назовите общие пути катаболизма аминокислот, специфические превращения по радикалу.
4. Какой процесс называется дезаминированием аминокислот? Назовите его виды и значение для клетки.
5. Назовите особенности окислительного дезаминирования глутаминовой кислоты, строение фермента глутаматдегидрогеназы, его локализацию.

6. Какой процесс называется трансаминированием? Укажите строение аминотрансфераз, механизм их действия, а также значение процесса в клетках организма. Назовите аминотрансферазы, имеющие клинико-диагностическое значение.
7. Назовите особенности непрямого дезаминирования аминокислот, его значение. Охарактеризуйте коллекторную функцию глутамата в метаболическом потоке азота аминокислот.
8. Укажите пути использования безазотистых остатков аминокислот в метаболизме. Какие аминокислоты называют гликогенными и кетогенными?
9. Какой процесс называют декарбоксилированием аминокислот. Назовите строение ферментов, роль продуктов реакций.
10. Напишите химизм инактивации биогенных аминов. Укажите аминоксидазы и их строение. Назовите фармакопрепараты - ингибиторы аминоксидаз.
11. Назовите роль гистамина в развитии аллергических реакций и воспаления. Приведите примеры антигистаминных препаратов.
12. Назовите особенности катаболизма некоторых аминокислот.
13. Укажите анаболические процессы, в которых принимают участие аминокислоты.

### Лабораторная работа 1

#### **Определение активности аминотрансфераз сыворотки крови**

Трансаминирование – обратимый перенос  $\alpha$ -аминогруппы аминокислоты на кетокислоту без промежуточного отщепления аммиака. Процесс катализируется ферментами аминотрансферазами, коферментом которых служит пиридоксальфосфат. Процесс активно протекает в печени, сердечной и скелетной мышцах, почках. В сыворотке крови активность аминотрансфераз очень низка и резко возрастает при нарушении целостности мембран тканей и органов.

*Материал исследования:* сыворотка крови.

#### *Принцип*

В результате переаминирования, происходящего под действием АсАТ и АлАТ образуются оксалоацетат и пируват. Оксалоацетат, подвергаясь декарбоксилированию, превращается в пируват. При добавлении кислого 2,4-динитрофенилгидразина энзиматический процесс останавливается и получается гидразон



пировиноградной кислоты. Последний в щелочной среде дает окрашивание, интенсивность которого пропорциональна количеству образовавшейся пировиноградной кислоты.

#### *Реактивы*

1) 0,1 М фосфатный буфер, рН 7,4, 2) 0,04% раствор бромтимолового синего, 3) Раствор субстрата АсАТ: смесь  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты и аспарагиновой кислоты, 4) Раствор субстрата АлАТ: смесь  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты и аланина, 5) Раствор 2,4-динитрофенилгидразина в 1 М НСl, 6) 0,4 М раствор NaOH, 7) 0,1 мкМ эталонный раствор пировиноградной кислоты.

#### *Проведение анализа*

	<b>1 проба, стандартная, мл</b>	<b>2 проба, опытная для АлАТ, мл</b>	<b>3 проба, опытная для АсАТ, мл</b>
Субстратный раствор АлАТ	0,25	0,25	–
Субстратный раствор АсАТ	–	–	0,25
Эталонный раствор	0,05	–	–
Сыворотка	–	0,05	0,05
Инкубируют 60 мин на водяной бане при 37°C.			
2,4-ДНФГ	0,25	0,25	0,25
Инкубируют при комнатной температуре в течение 20 мин			
NaOH	2,5	2,5	2,5
Инкубируют при комнатной температуре в течение 10 мин. Колориметрируют опытную пробу против контроля при зеленом светофильтре (500-560 нм)			

#### *Расчет*

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

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

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

*Нормальные величины*

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

*Оформление работы*

Отмечают принцип метода, регистрируют результаты анализа и делают вывод.

*Клинико-диагностическое значение*

Определение активности АсАТ и АлАТ и их отношения используются в клинической практике для выявления патологических процессов различных органов. В миокарде более высокая активность АсАТ, чем АлАТ, в печени обратное соотношение. При инфаркте миокарда значительно увеличивается активность АсАТ в сыворотке крови с одновременным повышением коэффициента АсАТ/АлАТ. При поражении печени (цирроз, сывороточный гепатит) более выражено повышается активность АлАТ, снижается АсАТ/АлАТ.

**ТЕМА 11.3. ОБЕЗВРЕЖИВАНИЕ АММИАКА В ОРГАНИЗМЕ***Актуальность*

Аммиак является высокотоксичным веществом. При катаболизме аминокислот (70 г в сутки), окислении биогенных аминов образуется большое количество аммиака, но уровень его в крови не превышает 40 мкмоль/л (3 ммоль/л для кроликов – летальная доза). Аммиак связывается в тканях с образованием нетоксичных соединений, выделяемых с мочой – мочевины, соли аммония, креатинин. Транспортной связанной формой  $\text{NH}_3$  служит глутамин. В клинической практике часто выявляются нарушения процессов нейтрализации аммиака.

*Цель*

Освоение методов определения количества мочевины в сыворотке крови и моче, креатинина в моче.

*Вопросы для самоподготовки*

1. Назовите основные пути образования аммиака. Укажите источники аммиака в тканях.
2. Назовите пути связывания аммиака.
3. Напишите механизм синтеза глутамина - транспортной формы аммиака.

4. Напишите химизм орнитинового цикла мочевинообразования. Укажите ферменты, значение процесса и следствие его нарушения.
5. Напишите химизм образования креатина и креатинина. Назовите значение процесса и его локализацию.
6. Какой процесс называется восстановительным аминированием? Напишите химизм процесса.
7. Какой процесс называется аммионогенезом? Назовите его локализацию, укажите схему процесса.
8. Назовите клинико-диагностическое значение определения мочевины, креатинина в сыворотке крови и моче.

### Лабораторная работа 1

#### **Диацетилмонооксимный метод определения содержания мочевины в сыворотке крови и моче**

##### *Принцип*

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

##### *Реактивы*

1) 10% раствор трихлоруксусной кислоты; 2) Рабочий раствор: смесь  $\text{FeCl}_3$ , диацетилмонооксима, тиосемикарбазида, ортофосфорной кислоты и конц.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; 3) стандартный раствор мочевины (16,65 ммоль/л).

##### *Материал исследования*

Сыворотка крови, моча (разведение 1:50)

##### *Проведение анализа*

	<b>ОПЫТ 1, мл</b>	<b>ОПЫТ 2, мл</b>	<b>СТАНДАРТ, мл</b>
Сыворотка	0,01	–	–
Моча	–	0,01	–
Стандарт мочевины	–	–	0,01
Рабочий реактив	2,0	2,0	2,0
Перемешивают. Закрывают крышкой из фольги. Выдерживают 20 мин в кипящей водяной бане и охлаждают под проточной водой. Измеряют оптическую плотность пробирок против воды при 530-560 нм (зеленый светофильтр) в кювете 1 см не			

позже, чем через 15 мин после охлаждения.

### *Расчет*

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

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

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

### *Нормальные величины*

Сыворотка крови

дети 1,8-6,4 ммоль/л

взрослые 2,5-8,3 ммоль/л

Моча 330-580 ммоль/сут

### *Оформление работы*

Отмечают принцип метода, регистрируют результаты анализа и делают вывод о возможных причинах нарушений.

### *Практическое значение*

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

## Лабораторная работа 2

### **Определение содержания креатинина в моче**

#### *Принцип*

Креатинин в щелочной среде образует с пикриновой кислотой пикрат креатинина оранжевого цвета; интенсивность окраски пропорциональна концентрации.

**Реактивы**

1) 10% раствор NaOH; 2) насыщенный раствор пикриновой кислоты; 3) стандартный раствор креатинина (0,177 ммоль/л).

*Материал для исследования:* моча (разведение 1:50)

**Проведение анализа**

	<b>ОПЫТ, мл</b>	<b>СТАНДАРТ, мл</b>
Моча	0,5	–
Стандартный раствор креатинина	–	0,5
Дистилл. вода	0,5	0,5
NaOH	0,5	0,5
Раствор пикриновой кислоты	0,5	0,5
	Перемешивают, через 20 мин измеряют оптическую плотность пробы против воды, при длине волны 500-560 нм (зеленый светофильтр).	

**Расчет:**

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

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

**Нормальные величины****Сыворотка крови**

дети	27-62 мкмоль/л
женщины	44-88 мкмоль/л
мужчины	44-100 мкмоль/л
Моча	4,4-17,7 ммоль/сут

**Оформление работы**

В отчете описывается принцип метода, фиксируются результаты и делается вывод по возможным заболеваниям.

**Клинико-диагностическое значение**

Увеличение концентрации креатинина в моче наблюдают у лиц с повышенной физической активностью, с лихорадочными состояниями. Оно отмечается при выраженной недостаточности функции печени, при сахарном и несахарном диабете, при синдроме длительного раздавливания, острых инфекциях. Снижение обнаруживается при хроническом нефрите, мышечной атрофии, с

дегенерацией и амилоидозом почек, лейкемией, при голодании. Уровень креатинина не является чувствительным показателем заболевания почек в ранней стадии.

#### **ТЕМА 11.4. ОБМЕН СЛОЖНЫХ БЕЛКОВ – НУКЛЕОПРОТЕИНОВ**

##### *Актуальность*

Существуют два типа нуклеопротеинов: дезоксирибонуклеопротеины (ДНП) и рибонуклеопротеины (РНП). ДНП в качестве простетической группы содержит дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК), а РНП – рибонуклеиновую кислоту (РНК). Они играют важную роль в хранении и реализации наследственной информации. Белковые компоненты нуклеопротеинов подвергаются превращениям, свойственным всем белкам. Структурные компоненты нуклеиновых кислот – мононуклеотиды, помимо этой роли, выполняют также другие важные функции: 1) цикл АДФ-АТФ участвует в трансформации энергии окисления веществ в энергию, используемую в эндогенных процессах организма; 2) адениловая кислота входит в состав коферментов дегидрогеназ (НАД, НАДФ, ФАД) и кофермента ацилирования (КоА); 3) УТФ, ГТФ и ЦТФ выполняют роль коферментов в реакциях переноса моносахаридных остатков; 4) ЦТФ служит коферментом холинтрансферазы; 5) циклические нуклеотиды 3'5'-цАМФ и 3'5'-цГМФ являются посредниками при передаче гормональных и других сигналов на внутриклеточные эффекторные системы.

Нуклеиновые кислоты не являются незаменимыми пищевыми факторами, и практически все клетки организма способны к синтезу нуклеотидов. Скоростью синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов определяется синтез нуклеиновых кислот. К заболеваниям, связанным с патологией обмена нуклеопротеинов, относятся подагра, мочекаменная болезнь, синдром Лёша-Нихена, оротацидурия, мегалобластическая анемия и другие. Нуклеотиды – лекарственные препараты успешно применяются в клинике с лечебной целью. Аналоги пуринов и пиримидинов, их нуклеозиды и нуклеотиды широко используются в клинической медицине и научных исследованиях. Изменения в структуре гетероциклического кольца или углеводного компонента приводят к образованию соединений, токсический эффект которых обусловлен: ингибированием определенных ферментов, участвующих в синтезе нуклеотидов или нуклеиновых кислот; включением синтетических

аналогов нуклеотидов в РНК или ДНК, где они нарушают комплементарное взаимодействие азотистых оснований или удлинение полинуклеотидных цепей. Примерами аналогов пуринов и пиримидинов являются некоторые противоопухолевые и противовирусные препараты ингибирующие синтез пуринов и пиримидинов (6-меркаптопурин, тиогуанин, 5-фторурацил, 5-йодурацил). Ингибитором фермента ксантиноксидазы является аллопуринол, препарат, применяемый при лечении подагры и синдрома Лёша-Нихена.

### *Цель*

Освоение методов качественного и количественного определения мочевой кислоты.

### *Вопросы для самоподготовки:*

1. Охарактеризуйте переваривание нуклеопротеинов и всасывание продуктов их распада в желудочно-кишечном тракте.
2. Охарактеризуйте анаболизм пуриновых нуклеотидов. Напишите реакцию образования 5-фосфорибозиламина, источники атомов азота и углерода пуринового кольца при синтезе ИМФ.
3. Напишите реакции синтеза АМФ и ГМФ из ИМФ, превращение нуклеозидмонофосфатов в трифосфаты.
4. Напишите биосинтез пиримидиновых нуклеотидов УМФ и ЦМФ, превращение их в трифосфаты. Назовите нарушения процесса метаболизма пиримидинов при оротацидурии.
5. Назовите механизм образования дезоксирибонуклеотидов, роль тиоредоксина и НАДФН<sub>2</sub> в этом процессе.
6. Охарактеризуйте синтез дТМФ. Назовите ферменты, катализирующие процесс, роль метилен - ТГФК и S-аденозилметионина.
7. Укажите регуляцию синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов по типу обратной связи, ее особенности.
8. Назовите нуклеотидные коферменты, укажите представление об их функции.
9. Охарактеризуйте катаболизм пуриновых нуклеотидов. Напишите химизм образования мочевой кислоты из АМФ и ГМФ. Укажите содержание мочевой кислоты в крови и моче.
10. Назовите молекулярные механизмы развития мочекаменной болезни, синдрома Лёша-Нихена, подагры. Укажите диету при гиперурикемии, причины эффективности аллопуринола при лечении подагры.

11. Напишите химизм распада пиримидиновых нуклеотидов, конечные продукты процесса, укажите их утилизацию.
12. Назовите ингибиторы синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, нуклеотиды – лекарственные препараты.
13. Отрадите механизм репликации в виде рисунка. Укажите матрицу синтеза, ферменты, структурный материал, энергетические источники, особенности, значение и локализацию процесса.
14. Отрадите механизм транскрипции в виде рисунка. Назовите матрицу синтеза, ферменты, структурный материал, значение процесса и локализацию. Охарактеризуйте процесс созревания пре-рНК.

Лабораторная работа 1  
**Обнаружение мочевой кислоты  
при помощи мурексидной пробы**

*Принцип*

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

*Реактивы*

1) конц.  $\text{HNO}_3$ , 2) конц. раствор  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 3) 10% раствор  $\text{KOH}$ .

*Материал исследования*

Кристаллы мочевой кислоты.

*Проведение анализа*

Кристаллы мочевой кислоты помещают на дно фарфоровой чашки, смачивают каплями азотной кислоты (осторожно!), выпаривают досуха (не выше  $70^\circ\text{C}$ ). Появляется коричнево-красное пятно, которое после охлаждения и осторожном смачивании с одного края аммиаком окрашивается в пурпурно-красный цвет, при смачивании с другого края раствором  $\text{KOH}$  – в сине-фиолетовый.

*Оформление работы*

Отмечают принцип метода, регистрируют результаты анализа и делают вывод.

*Практическое значение*

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



## Лабораторная работа 2

### Количественное определение мочевой кислоты в моче

#### *Принцип*

Мочевая кислота восстанавливает фосфорновольфрамный реактив, развивается синяя окраска, интенсивность которой пропорциональна количеству мочевой кислоты. Количество образовавшейся фосфорновольфрамной сини определяют путем титрования калием гексацианоферратом (III)  $K_3[Fe(CN)_6]$ , который окисляет фосфорновольфрамную синь и окраска исчезает.

#### *Реактивы*

1) 20% раствор  $Na_2CO_3$ , 2) фосфорновольфрамный реактив, 3) 3,992 моль/л раствор  $K_3[Fe(CN)_6]$ .

*Материал исследования:* моча

#### *Проведение анализа*

В колбу наливают 5 мл мочи, добавляют 2 мл фосфорновольфрамного реактива и 10 мл раствора  $Na_2CO_3$ , перемешивают. Из бюретки (осторожно!) по каплям приливают раствор  $K_3[Fe(CN)_6]$  до исчезновения синего окрашивания.

#### *Расчет*

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

где  $C_{\text{оп}}$  – концентрация мочевой кислоты в пробе,  $C_{\text{ст}}$  – концентрация стандартного раствора мочевой кислоты, соответствующего 1 мл раствора  $K_3[Fe(CN)_6]$  – 0,004 моль;  $B$  – объем мочи взятый для анализа,  $A$  – количество мл раствора  $K_3[Fe(CN)_6]$ , пошедшего на титрование,  $Д$  – суточный диурез (1200-1500 мл).

#### *Нормальные величины*

Сыворотка крови

дети 0,12-0,32 ммоль/л

мужчины 0,24-0,50 ммоль/л

женщины 0,16-0,44 ммоль/л

Моча 2,36-5,90 ммоль/сут

#### *Оформление работы*

При оформлении работы записывают принцип метода, используемый реактив и результаты проведения анализа. Отмечают практическую значимость работы и делают вывод о наличии патологии.

### *Клинико-диагностическое значение*

Уровень мочевой кислоты в крови (мононатриевая соль в комплексе с белком) определяется интенсивностью синтеза и выделением из организма. Повышение содержания мочевой кислоты наблюдается при уменьшении выделения ее почками, избыточном образовании (лейкозы). Повышение содержания мочевой кислоты в крови (гиперурикемия) является главным симптомом подагры. При подагре мочевая кислота откладывается в тканях, суставных сумках, хрящах, сухожилиях, суточное количество в моче снижается. Белки сыворотки стабилизируют ураты, но при снижении pH мочевая кислота кристаллизуется в тканях.

Основным фармакологическим препаратом, используемым для лечения подагры, является аллопуринол, действие которого основано на ингибировании ксантиноксидазы. Ксантиноксидаза ускоряет окисление гипоксантина в ксантин и ксантина в мочевую кислоту. Донором электронов и кислорода в реакции является вода. Окисление происходит при непосредственном участии молибден – оксо-сульфидного комплекса в активном центре ксантиноксидазы. Аллопуринол, являясь структурным аналогом гипоксантина, превращается на первой стадии окисления в аллоксантин, который связывается с молибденовым комплексом в активном центре ксантиноксидазы, вызывая ингибирование фермента.

Гиперурикемия также наблюдается при всех заболеваниях, связанных с распадом нуклеопротеинов: лейкозы, лечение цитостатиками, облучение. У таких больных наблюдается образование мочевых камней.

Гипоурикемия отмечается при анемии, при приеме салицилатов, кортикотропина.

Злоупотребление алкоголем, отравление солями тяжелых металлов, заболевания почек уменьшают экскрецию мочевой кислоты (гипоурикемия). Экскрецию уратов повышают салицилаты, соли лития.

## **ТЕМА 11.5. ОБМЕН СЛОЖНЫХ БЕЛКОВ – ГЕМОПРОТЕИНОВ**

### *Актуальность*

Изучение и практическое исследование обмена гемопротенинов привлекает внимание по нескольким причинам: во-первых, вследствие широкого разнообразия биологически важных функций гемоглобина и цитохромов – основных представителей гемопротенинов; во-вторых, изменения синтеза и распада

порфиринов и, соответственно, их комплексов с белками, приводят к развитию болезней крови, печени, желчных путей, в том числе желтух различной этиологии. Актуальность изучения гемопротеинов заключается в рассмотрении механизмов обезвреживания чужеродных лекарственных веществ (ксенобиотиков). Основное значение в биотрансформации ксенобиотиков играет микросомальное окисление. Ключевую роль в этом процессе выполняет цитохром P<sub>450</sub>, являясь по структуре гемопротеином, он содержит простетическую группу гем и имеет, участки связывания для кислорода и субстрата (ксенобиотика). В результате один атом кислорода включается в окисляемое вещество (ROH), а другой, связывая два иона водорода из среды, входит в состав воды. Таким образом, в результате окисления с участием цитохрома P<sub>450</sub> происходит модификация веществ с образованием функциональных групп, повышающих растворимость гидрофобных соединений и облегчающих процесс выведения чужеродных веществ из организма.

#### *Цель*

Освоить методы определения гемоглобина и билирубина – основных показателей пигментного обмена для оценки его состояния.

#### *Вопросы для самоподготовки:*

1. Назовите особенности строения гемсодержащих белков. Напишите строение гема.
2. Охарактеризуйте разнообразие гемопротеинов (гемоглобин, миоглобин, цитохромы, каталаза). Укажите их локализацию и биологическую роль.
3. Напишите химизм синтеза гема и гемоглобина, укажите регуляцию процессов, их нарушения.
4. Охарактеризуйте обмен железа: всасывание, транспорт, депонирование. Назовите суточную потребность.
5. Охарактеризуйте превращение гемоглобина в тканях. Укажите производные формы гемоглобина (оксигемоглобин, карбоксигемоглобин и др.).
6. Назовите физиологические и аномальные типы гемоглобина, понятие метгемоглобинемия.
7. Напишите химизм распада гемоглобина. Назовите особенности форм билирубина, их свойства и локализация процесса образования.

8. Назовите роль фермента УДФ-глюкуронилтрансферазы в превращении билирубина. Напишите химизм реакции.
9. Охарактеризуйте процесс выведения конечных продуктов распада гема из организма.
10. Назовите нарушение обмена желчных пигментов. Укажите классификацию и особенности форм желтух.
11. Назовите диагностическое значение определения желчных пигментов в крови и моче, выявление вида желтухи.

### Лабораторная работа 1

#### Определение концентрации гемоглобина в крови гемоглобинцианидным методом

##### Принцип

Гемоглобин при взаимодействии с гексацианоферратом калия (красная кровяная соль) окисляется в метгемоглобин, образующий с ацетонциангидрином окрашенный гемоглобинцианид, интенсивность окраски которого пропорциональна количеству гемоглобина.

##### Реактивы

1) Трансформирующий реактив (смесь ацетонциангидрина, гексацианоферрата калия, двууглекислого натрия); 2) стандартный раствор гемоглобинцианида (150 г/л).

*Материал исследования:* кровь

##### Проведение анализа

	ОПЫТ, мл	КОНТРОЛЬ, мл
Кровь	0,02	–
Стандартный раствор	–	0,02
Трансформирующий раствор	5,0	5,0
Перемешивают. Через 10 минут колориметрируют на ФЭК при длине волны 500-560 нм (зеленый светофильтр)		

##### Расчет:

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

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

##### Нормальные величины

Кровь

женщины	120-140 г/л
мужчины	130-160 г/л

### Лабораторная работа 2

## Определение концентрации билирубина и его фракций в сыворотке крови по диазореакции Эрлиха

### Принцип

При взаимодействии сульфаниловой кислоты с азотистым натрием образуется диазофенилсульфоная кислота (диазореактив), которая с прямым билирубином дает розово-фиолетовое окрашивание. По интенсивности окраски судят о концентрации прямого (связанного) билирубина. После добавления к сыворотке кофеинового реактива непрямой билирубин переходит в растворимое состояние и с диазореактивом также дает розово-фиолетовое окрашивание. По интенсивности этой окраски определяют общее содержание билирубина.

*Материал исследования сыворотка крови*

### Реактивы

1) сульфаниловая кислота в HCl (реагент N 1), 2) натрий азотистокислый, NaNO<sub>2</sub> (реагент N 2), 3) кофеиновый реактив (реагент N 3), 4) буферный раствор (реагент N 4), 5) 0,9% раствор NaCl, 6) стандартный раствор билирубина, 200 мкмоль/л.

### Проведение реакции

Реактивы	Опытная проба	Стандартная проба
Реактив (сульфаниловая кислота)–реагент №1	0,2	0,2
NaNO <sub>2</sub> –реагент №2	1 капля	1 капля
Кофеиновый реактив-реагент №3	1 мл	1 мл
Сыворотка	0,2	–
Стандартный раствор билирубина	–	0,2

Перемешивают, появляется слабо-розовое окрашивание. Через 20 минут колориметрируют при 540 нм (зеленый светофильтр).

### Расчет:

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

где  $E_{оп}$  – оптическая плотность пробы,  $E_{ст}$  – оптическая плотность стандарта,  $C_{ст}$  – концентрация стандартного раствора билирубина, 5 мкмоль/л

*Нормальные величины*

### *Общий билирубин*

Сыворотка крови

Дети

кровь из пуповины

возраст до 5 дней

впоследствии

Взрослые

Доношенные

< 34,2 мкмоль/л

< 205,2 мкмоль/л

3,4-17,1 мкмоль/л

8,5-20,5 мкмоль/л

Недоношенные

< 34,2 мкмоль/л

< 273,6 мкмоль/л

### *Прямой билирубин*

Сыворотка крови (взрослые)

2,2-5,1 мкмоль/л

Моча

билирубин

отсутствует

уробилиновые тела

4 мг/сут

Кал

билирубин

отсутствует

стеркобилиноген

50-300 мг/сут

### Лабораторная работа 3

### **Определение концентрации билирубина в моче экспресс-методом**

#### *Принцип*

В основе метода лежит та же качественная реакция на билирубин, что и при определении билирубина в сыворотке крови.

#### *Материал исследования*

Моча нормальная и патологическая с желчными пигментами

#### *Реактивы*

Диагностические полоски «Билифан».

#### *Проведение реакции*

Диагностическую полоску погружают в исследуемую мочу и немедленно вынимают. Спустя одну минуту сравнивают окраску зоны индикации с цветной шкалой сравнения на этикетке. Анализ проводят с нормальной и патологической мочой.

Концентрация билирубина определяется по оттенкам окраски зоны индикации в соответствии с таблицей:

Обозначения по шкале	Концентрация билирубина	
	мг/л	ммоль/л
1	3-6	5-10
2	6-12	10-21
3	12-24	21-41
4	30	51

*Практическое значение определения билирубина в сыворотке и моче*

В **сыворотке** накопление билирубина свыше 43 мкмоль/л ведет к связыванию его эластическими волокнами кожи и конъюнктивы, что проявляется в виде желтухи. Для дифференциальной диагностики желтух необходимо определить, за счет какой фракции возникает билирубинемия:

1. Гемолитическая (или надпеченочная) желтуха – ускоренное образование билирубина в результате гемолиза, гипербилирубинемия развивается за счет фракции непрямого билирубина. В моче резко возрастает содержание уробилиновых тел, билирубин отсутствует. В кале увеличено содержание стеркобилина. К данному типу желтух относятся гемолитические анемии различного происхождения, В<sub>12</sub>-дефицитная анемия, могут наблюдаться врожденные формы – врожденный сфероцитоз, дефицит глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы.

2. Печеночная (или паренхиматозная) желтуха – нарушено извлечение билирубина печеночными клетками, его конъюгирование и выведение, гипербилирубинемия развивается за счет обеих фракций. Количество непрямого билирубина возрастает за счет функциональной недостаточности гепатоцитов или снижения их количества, а прямого – за счет увеличения проницаемости мембран клеток печени. В моче определяется билирубин, умеренно увеличена концентрация уробилиновых тел, уровень стеркобилина кала в норме или снижен. Наблюдается при вирусных и других формах гепатитов, циррозе и опухолях печени, жировой дистрофии, при других состояниях.

3. Механическая (или подпеченочная, обтурационная) желтуха развивается вследствие нарушения оттока желчи при закупорке желчного протока, в результате застоя желчи идет растяжение желчных капилляров, увеличивается их проницаемость. Не имеющий оттока в желчь прямой билирубин поступает в кровь, в результате развивается гипербилирубинемия. В тяжелых случаях, вследствие переполнения гепатоцитов прямым билирубином,

конъюгация его с глюкуроновой кислотой может нарушаться, и в крови будет увеличиваться количество несвязанного билирубина. В моче резко увеличен уровень билирубина, практически отсутствует стеркобилин кала. Кроме указанных причин, подпеченочные желтухи выявляются при новообразованиях поджелудочной железы и гельминтозах.

В моче билирубин является патологическим компонентом. Показатель полезен в дифференциальной диагностике, поскольку билирубинурия характерна для обтурационной и паренхиматозной желтух (повышение уровня связанного билирубина в сыворотке), но отсутствует при гемолитической. При гепатите билирубин может быть обнаружен в моче до появления желтухи.

Таблица

Содержание основных пигментов в сыворотке крови, моче и кале здоровых людей и при различных типах желтух.

Пигменты	Типы желтух		
	Гемолитическая	Паренхиматозная	Обтурационная
Билирубин крови			
общий	↑	↑	↑↑
свободный	↑↑	↑	N или ↑
связанный	N или ↑	↑	↑↑
Билирубин мочи	N	N или ↑	↑
Уробилин мочи	↑↑	↑	↓
Стеркобилин кала	↑↑	N или ↓	Отсутствует

#### Оформление работы

В протокол опыта следует внести принцип методов, результаты опыта. Сравнить результаты с нормальными величинами и дать оценку состояния больного.

### ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ПО РАЗДЕЛУ «ОБМЕН БЕЛКОВ»

1. РАСЩЕПЛЕНИЕ БЕЛКОВ В ЖЕЛУДКЕ ПРОИСХОДИТ ПОД ВЛИЯНИЕМ ФЕРМЕНТА:
  - 1) пепсиногена
  - 2) трипсина
  - 3) пепсина
  - 4) энтерокиназы



2. РАСЩЕПЛЕНИЕ БЕЛКОВ ДО ПОЛИПЕПТИДОВ В КИШЕЧНИКЕ ОСУЩЕСТВЛЯЕТ ФЕРМЕНТ:
  - 1) трипсиноген
  - 2) трипсин
  - 3) карбоксипептидаза
  - 4) химотрипсиноген
3. ОТЩЕПЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТЫ С С-КОНЦА БЕЛКОВОЙ МОЛЕКУЛЫ ОСУЩЕСТВЛЯЕТ ФЕРМЕНТ:
  - 1) карбоксипептидаза
  - 2) дипептидаза
  - 3) аминопептидаза
  - 4) химотрипсин
4. ДЛЯ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ХАРАКТЕРЕН ПУТЬ ДЕЗАМИНИРОВАНИЯ АМИНОКИСЛОТ:
  - 1) внутримолекулярный
  - 2) окислительный
  - 3) гидролитический
  - 4) восстановительный
5. ПРЯМОМУ ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ ДЕЗАМИНИРОВАНИЮ ПОДВЕРГАЕТСЯ АМИНОКИСЛОТА:
  - 1) лейцин
  - 2) валин
  - 3) глутамат
  - 4) серин
  - 5) аспартат
6. АМИНОКИСЛОТА ТИРОЗИН ЯВЛЯЕТСЯ СИНТЕТИЧЕСКИМ ПРЕДШЕСТВЕННИКОМ:
  - 1) тироксина
  - 2) инсулина
  - 3) адреналина
  - 4) норадреналина
  - 5) альдостерона
7. В ПРОЦЕССЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ ТРИПТОФАНА ОБРАЗУЕТСЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЕ ВЕЩЕСТВО:
  - 1) кортикостерон
  - 2) тироксин
  - 3) серотонин
  - 4) гистамин

8. МЕДИАТОР ГАМК ОБРАЗУЕТСЯ ПРИ ДЕКАРБОКСИЛИРОВАНИИ АМИНОКИСЛОТЫ:
- 1) аспартата
  - 2) глутамата
  - 3) треонина
  - 4) лейцина
9. АКЦЕПТОРАМИ АММИАКА В КЛЕТКЕ ЯВЛЯЮТСЯ АМИНОКИСЛОТЫ:
- 1) аланин
  - 2) глутамат
  - 3) глицин
  - 4) аспарат
10. ДЛЯ МЛЕКОПИТАЮЩИХ НЕЗАМЕНИМЫМИ ЯВЛЯЮТСЯ АМИНОКИСЛОТЫ:
- 1) аланин
  - 2) серин
  - 3) лизин
  - 4) глутамин
  - 5) валин
11. ИСТОЧНИКОМ В СИНТЕЗЕ НИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ СЛУЖИТ АМИНОКИСЛОТА:
- 1) орнитин
  - 2) лизин
  - 3) триптофан
  - 4) гистидин
12. В РЕЗУЛЬТАТЕ РАБОТЫ ОРНИТИНОВОГО ЦИКЛА ОБРАЗУЕТСЯ:
- 1) мочева кислота
  - 2) мочевина
  - 3) креатин
  - 4) аммиак
13. МОЧЕВАЯ КИСЛОТА ЯВЛЯЕТСЯ КОНЕЧНЫМ ПРОДУКТОМ:
- 1) орнитинового цикла
  - 2) распада пуриновых нуклеотидов
  - 3) распада пиримидиновых нуклеотидов

### **СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ ПО РАЗДЕЛУ «ОБМЕН БЕЛКОВ»**

1. Больного беспокоят боли в области желудка, отрыжка с неприятным запахом «тухлых яиц». Какие процессы могут быть

причиной таких симптомов. Что следует рекомендовать для нормализации процессов пищеварения?

2. При анализе мочи пациента обнаружено повышенное количество индикана. Какова его химическая природа, возможная причина индиканурии?
3. В приемный покой больницы поступил мужчина с жалобами на острые боли в области сердца. Врач заподозрил инфаркт миокарда и предложил исследовать активность аминотрансфераз крови. Активность каких аминотрансфераз, и почему, может измениться в крови при заболевании сердца?
4. У больного при поступлении в стационар жалобы на аллергические явления. Какой биогенный амин и какой фермент целесообразно определить?
5. У ребенка содержание в крови фенилаланина 5 мкмоль/л (при норме 0,2 мкмоль/мл), с мочой выделяется большое количество этой аминокислоты. Какие процессы обмена нарушены, как называется заболевание, как вскармливать ребёнка?
6. Накопление аммиака в клетках мозга является непосредственной причиной нарушения психического состояния при циррозах печени. Причиной токсического действия аммиака считается вторжение его в энергетический метаболизм клетки. Назовите возможный механизм токсического действия аммиака.

## РАЗДЕЛ 12. ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

### ТЕМА 12.1. БИОХИМИЯ ГОРМОНОВ БЕЛКОВО-ПЕПТИДНОЙ ПРИРОДЫ И ПРОИЗВОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ

#### *Актуальность*

Одной из особенностей живых организмов является их способность сохранять постоянство гомеостаза при помощи механизмов саморегуляции, в осуществлении которых одно из главных мест принадлежит гормонам. Все заболевания эндокринных желез развиваются как результат нарушения молекулярных механизмов регуляции процессов обмена, вызванных недостаточным или избыточным синтезом соответствующих гормонов в организме человека. В клинике широко используют гормоны и гормональные препараты для лечения эндокринных и неэндокринных заболеваний.

#### *Цель*

Освоение методов обнаружения гормонов.

#### *Вопросы для самоподготовки*

1. Назовите общие принципы регуляции обменных процессов, ее уровни.
2. Назовите понятие «гормон», общие биологические признаки гормонов.
3. Назовите классификации гормонов по химическому строению, принадлежности к эндокринным железам и биологическим функциям.
4. Назовите нейроэндокринные взаимосвязи, роль гипоталамуса. Укажите механизм обратной (отрицательной) связи в регуляции образования и действия гормонов.
5. Назовите основные механизмы передачи гормональных сигналов в клетки-мишени; системы вторичных посредников и их взаимодействие (цАМФ, цГМФ, ДАГ, ИФ<sub>3</sub>, ионы Ca<sup>2+</sup>). Укажите гормоны, в основе действия которых лежит образование вторичного посредника, и гормоны, действие которых проявляется на уровне генома клетки.
6. Назовите гормоны гипоталамуса и гипофиза, их химическую природу и биологическую роль. Охарактеризуйте основные нарушения при гипо- и гиперфункции гипофиза (гипофизарный нанизм, акромегалия, гигантизм).

7. Назовите химическую природу, регуляцию образования, механизмы биологических эффектов гормонов вазопрессина и окситоцина. Укажите патогенез основных симптомов несахарного диабета.
8. Назовите гормоны щитовидной железы. Охарактеризуйте строение трийодтиронина и тироксина, основные этапы синтеза и катаболизма гормонов, регуляцию их образования, биологическое действие гормонов. Укажите гипо- и гиперфункции щитовидной железы: нарушения метаболизма и функций органов при кретинизме, микседеме, базедовой болезни.
9. Назовите химическую природу, охарактеризуйте участие в регуляции обмена кальция и фосфатов гормонов паратгормона и кальцитонина. Укажите роль витамина D, основные симптомы гипо- и гиперпаратиреозидизма.
10. Охарактеризуйте гормон поджелудочной железы - глюкагон. Назовите его химическую природу, участие в регуляции обмена веществ. Укажите механизм гипергликемии под влиянием глюкагона.
11. Охарактеризуйте гормон поджелудочной железы – инсулин. Укажите строение, образование из проинсулина, регуляцию синтеза и секреции, органы-мишени и механизм действия гормона, роль в регуляции обмена углеводов, липидов и белков, биохимические механизмы анаболических эффектов инсулина.
12. Назовите формы сахарного диабета. Укажите возможные причины инсулиновой недостаточности, клинические симптомы и метаболические нарушения при сахарном диабете, его осложнения.
13. Назовите гормоны мозгового слоя надпочечников. Адреналин, строение и синтез гормона, содержание в крови и его транспортные формы, сердечно-сосудистый эффект, роль в обмене веществ, механизмы гипергликемии и липолитического действия гормона.
14. Укажите период полураспада адреналина и конечные продукты катаболизма, участие гормона в адаптивных реакциях при стрессе. Назовите механизм лечебного действия адреналина при сердечном коллапсе и приступах астмы.

**Задание для самоподготовки**

Составьте таблицу по приведенной схеме:

Название и химическая природа	Место синтеза	Органы-мишени	Локализация рецепторов, механизм действия	Влияние на обмен				Болезни, обусловленные отсутствием или избытком гормона
				Углеводов	белков	липидов	минеральных веществ	

**МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГОРМОНОВ**

Количество гормонов в биологических жидкостях определяется двумя способами: биологическими (исследования на животных) и химическими. Химическими методами определения гормонов являются:

1. Колориметрические методы, основанные на способности гормонов образовывать окрашенные соединения и измерении интенсивности поглощения света на спектрофотометре.
2. Флуориметрический метод, основанный на превращении гормонов во флуоресцирующие продукты и измерении интенсивности флуоресценции.
3. Хроматографический метод (тонкослойная бумажная хроматография, хроматография на ионообменных смолах), основанный на распределении гормонов на различных носителях с последующей их идентификацией.
4. Электрофоретический метод, основанный на распределении гормонов под влиянием внешнего электрического поля и их проявлении.
5. Радиоиммунологический метод, разработанный лауреатом Нобелевской премии Розалиндой Ялоу. Отличается не только высокой специфичностью, но и высокой чувствительностью. Метод основан на способности меченого радиоактивным изотопом гормона конкурировать с нативным гормоном за связывание с антителами к гормону *in vitro*. По количеству радиоактивного гормона, вытесненного из комплекса «меченый гормон–антитело» рассчитывают концентрацию гормона в

образце крови. Радиоактивность оценивают на  $\beta$ -счетчике или автоматическом сцинтилляционном устройстве

Указанные методы требуют специальной аппаратуры. На практических занятиях студенты знакомятся с качественными реакциями на гормоны.

### Лабораторная работа 1

#### Качественные реакции определения инсулина

##### *Принцип*

Инсулин является простым белком и дает характерные качественные реакции на белок: биуретовую, ксантопротеиновую, Фоля и др. Эти реакции не специфичны.

*Материал исследования:* раствор инсулина

##### *Реактивы*

1) 10% и 30% растворы NaOH, 2) 1% раствор  $\text{CuSO}_4$ , 3) реактив Фоля, содержащий 5% раствор  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$  и 30% раствор NaOH, 4) концентрированная  $\text{HNO}_3$ , 5) раствор натрия нитропруссид, 6) реактив Миллона – раствор нитратов ртути (I) и (II) в  $\text{HNO}_3$  с примесью  $\text{HNO}_2$  7) раствор нингидрина

##### *Проведение анализа*

В пробирки наливают по 5 капель раствора инсулина и проводят качественные реакции на белок.

##### *БИУРЕТОВАЯ РЕАКЦИЯ.*

В пробирку с раствором инсулина вносят 3 капли 10% NaOH и 1 каплю  $\text{CuSO}_4$ .

##### *НИНГИДРИНОВАЯ РЕАКЦИЯ*

Раствор инсулина смешивают с 5 каплями раствора нингидрина. Пробирки нагревают и кипятят 1 минуту. Отмечают появление сине-фиолетового окрашивания.

##### *КСАНТОПРОТЕИНОВАЯ РЕАКЦИЯ*

К раствору инсулина добавляют 2 капли концентрированной азотной кислоты и осторожно нагревают. Наблюдают за появлением желтого окрашивания переходящего при добавлении 30% NaOH в оранжевое.

##### *РЕАКЦИЯ МИЛЛОНА*

В раствор инсулина добавляют 3 капли реактива Миллона (раствор нитратов ртути (I) и (II) в  $\text{HNO}_3$  с примесью  $\text{HNO}_2$ ).

Осторожно нагревают. Белый осадок белка при нагревании окрашивается в кроваво-красный цвет.

*РЕАКЦИЯ НА СЕРОСОДЕРЖАЩИЕ АМИНОКИСЛОТЫ*

Раствор инсулина и 5 капель 30% раствора NaOH кипятят 1-2 минуты. Разделяют содержимое на 2 части для реакций «а» и «б».

*РЕАКЦИЯ ФОЛЯ*

К 5 каплям гидролизата инсулина добавляют 1 каплю раствора уксуснокислого свинца и нагревают до кипения. Отмечают появление бурого или черного осадка.

*РЕАКЦИЯ С НИТРОПРУССИДОМ*

К 5 каплям гидролизата инсулина добавляют 2-3 капли раствора натрия нитропрусида. Отмечают появление красно-коричневого окрашивания.

Лабораторная работа 2

**Качественные реакции определения адреналина**

*Реактивы*

1) 10% раствор NaOH, 2) 0,15М раствор FeCl<sub>3</sub>.

*КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ С FeCl<sub>3</sub>*

*Принцип*

Раствор FeCl<sub>3</sub>, реагируя с пирокатехиновым кольцом, входящим в молекулу адреналина, образует продукты зеленого цвета.

*Материал исследования:* раствор адреналина

*Проведение анализа*

В пробирку наливают по 10 капель раствора адреналина и добавляют 1 каплю раствора FeCl<sub>3</sub>. Наблюдают зеленое окрашивание. После добавления 1 капли 10% раствора NaOH окраска переходит в вишнево-красную.

*ФЛЮОРЕСЦЕНЦИЯ ПРОДУКТОВ ОКИСЛЕНИЯ*

*АДРЕНАЛИНА*

*Принцип*

Адреналин, окисляясь кислородом воздуха, в щелочной среде образует флюоресцирующие продукты



*Материал исследования:* раствор адреналина

*Оборудование:* флюороскоп

*Проведение анализа*

К 10 каплям дистиллированной воды приливают 6 капель 10% раствора NaOH и 2-4 капли раствора адреналина. Поместив пробирку перед включенным флюороскопом, наблюдают зеленую флюоресценцию продуктов окисления адреналина.

### Лабораторная работа 3

#### Качественная реакция определения тироксина

*Реактивы*

1) 10% раствор NaOH, 2) 10% раствор H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3) 2% раствор KJ, 4) 10% раствор NaHCO<sub>3</sub>, 5) 1% раствор крахмала, 6) лакмусовая бумага, 7) 0,5% спиртовой раствор фенолфталеина,

*Материал исследования*

Гидролизат тиреоидина, приготовленный на основе таблеток тиреоидина (в ступку помещают 10 таблеток и тщательно растирают, затем к растертой массе в колбу добавляют 20 мл раствора натрия бикарбоната, колбу с обратным холодильником помещают на асбестовую сетку и содержимое колбы кипятят точно 15 мин (с момента закипания) при умеренном нагревании).

*Проведение анализа*

Для обнаружения йода в гидролизате тиреоидина в пробирку наливают 24 капли гидролизата тиреоидина, прибавляют 3 капли раствора крахмала, 1 каплю фенолфталеина, 4 капли KJ и 10-15 капель раствора серной кислоты до прекращения выделения пузырьков углекислого газа и появления синего окрашивания.

*Оформление работы*

Записывают принцип методов. Результаты оформляют в виде таблицы:

Гормон	Химическая природа	Качественная реакция	Результаты

### Лабораторная работа 4

#### Влияние адреналина на содержание глюкозы в крови

Адреналин оказывает влияние на углеводный обмен, усиливая распад гликогена в печени до глюкозы. Поэтому при его введении содержания глюкозы в крови увеличивается.

*Материал исследования*

Цельная кровь, взятая до и после введения адреналина.

*Проведение анализа*

Кролика взвешивают, из ушной вены в пробирку, смоченную антикоагулянтом, берут кровь, в которой определяют содержание глюкозы. Затем животному вводят подкожно 0,1% раствор адреналина из расчета 0,3 мл на 1 кг массы тела. Через 30 мин после введения адреналина повторно берут кровь и снова определяют содержание глюкозы одним из известных методов.

На практических занятиях работу проводят с готовыми образцами крови, взятыми до и после введения адреналина, в которых определяют содержание глюкозы глюкозооксидазным методом.

*Оформление работы*

Записывают принцип метода. Результаты оформляют в виде таблицы:

Масса кролика	Доза введенного адреналина, мл	Содержание глюкозы, ммоль/л	
		до введения гормона	после введения гормона

Сделать вывод об особенностях действия адреналина на количество глюкозы в крови и отметить механизм его действия.

**ТЕМА 12.2. БИОХИМИЯ ГОРМОНОВ СТЕРОИДНОЙ ПРИРОДЫ***Актуальность*

Гормоны коры надпочечников и половых желез – это основные жирорастворимые стероидные гормоны. Они участвуют в адаптационных реакциях на внешние раздражители, регулируют размножение, рост и развитие организма, влияют на дифференцировку тканей, формирование поведенческих реакций. В клинике глюкокортикоиды применяют как противовоспалительные, антиаллергические и антииммунные препараты, а половые гормоны и их гормональные препараты используют в онкологической практике, в заместительной гормонотерапии, в гормональной контрацепции.

*Цель*

Изучить влияние адреналина на концентрацию глюкозы в крови.

*Вопросы для самоподготовки:*

1. Назовите основные этапы синтеза стероидных гормонов, ключевое соединение на пути их синтеза и специфические гидроксилазы, определяющие образование отдельных групп стероидов.
2. Назовите роль гипоталамо-гипофизарной системы и механизм отрицательной обратной связи в регуляции образования и секреции стероидных гормонов.
3. Напишите строение основных глюкокортикоидов: кортизола и кортикостерона. Укажите содержание в крови и их транспортные формы. Период полураспада гормонов и конечные продукты их катаболизма.
4. Назовите органы-мишени для глюкокортикоидов, механизм передачи гормонального сигнала в клетки-мишени и изменения метаболизма в них.
5. Охарактеризуйте регуляцию глюконеогенеза глюкокортикоидами, механизм развития гипергликемии под влиянием глюкокортикоидов.
6. Назовите роль глюкокортикоидов в адаптационном синдроме (исследования Г.Селье), гипо- и гиперкортицизм, нарушение метаболизма. Какое состояние называют стероидным диабетом?
7. Назовите глюкокортикоиды – лекарственные препараты, механизм противовоспалительного и антиаллергического действия глюкокортикоидов.
8. Напишите строение минералокортикоидов – альдостерона и дезоксикортикостерона. Укажите содержание в крови и их транспортные формы, органы-мишени для минералокортикоидов, механизм их действия и влияние на водно-солевой обмен.
9. Назовите роль ренин-ангиотензиновой системы в регуляции синтеза и секреции альдостерона, гипо- и гиперальдостеронизм, нарушение метаболизма, биохимический механизм почечной гипертензии.
10. Напишите строение основных женских половых гормонов – прогестерона и эстрадиола. Укажите место их образования, роль гипоталамо-гипофизарной системы и механизм отрицательной обратной связи в регуляции синтеза прогестерона и эстрадиола.
11. Назовите органы-мишени для прогестерона и эстрадиола, их биологическую роль в обеспечении репродуктивной функции организма женщины, особенности регуляции секреции,

применение синтетических аналогов эстрогенов и прогестинов в качестве контрацептивов.

12. Напишите строение основного мужского полового гормона – тестостерона. Укажите место образования, роль гипоталамо-гипофизарной системы и механизм отрицательной обратной связи в регуляции синтеза гормона.
13. Назовите органы-мишени для тестостерона, механизм действия и его биологическую роль в мужском организме.
14. Укажите период полураспада андрогенов и конечные продукты их катаболизма.
15. Назовите синтетические анаболические стероиды в качестве лекарственных препаратов.

### Лабораторная работа 1

#### Качественные реакции определения фолликулина

##### *Реактивы*

1) 30% раствор NaOH, 2) реактив Фолина, 3) концентрированная  $H_2SO_4$ , 4) 2% раствор *m*-динитробензола в абсолютном этиловом спирте.

##### *КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ С КОНЦЕНТРИРОВАННОЙ СЕРНОЙ КИСЛОТОЙ*

##### *Принцип*

Фолликулин с серной кислотой образует эфирные соединения соломенно-желтого цвета с зеленой флюоресценцией.

##### *Материал исследования*

Спиртовый или масляный раствор фолликулина

##### *Проведение анализа*

В пробирку наливают 20-30 капель спиртового раствора фолликулина и помещают в кипящую водяную баню на 5-10 минут для удаления спирта. Затем в пробирку осторожно добавляют 20-30 капель конц.  $H_2SO_4$  и вновь помещают пробирку в кипящую водяную баню на 5-10 мин. Постепенно появляется соломенно-желтое окрашивание, переходящее в оранжевое. Поднося пробирку к флюороскопу, наблюдают зеленую флюоресценцию.

С масляным раствором фолликулина реакцию проводят при комнатной температуре. К 2 каплям масляного раствора фолликулина прибавляют 30 капель конц.  $H_2SO_4$ . Постепенно появляется соломенно-желтое окрашивание.

### КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ С РЕАКТИВОМ ФОЛИНА

#### Принцип

Фолликулин восстанавливает фосфорновольфрамный реактив (реактив Фолина) с образованием окрашенных продуктов. Реакция обусловлена наличием фенольной группировки в молекуле фолликулина.

#### Материал исследования

Спиртовый или масляный раствор фолликулина

#### Проведение анализа

В пробирку вносят 5 капель раствора фолликулина и добавляют по 2 капли раствора NaOH и реактива Фолина. Появляется синее окрашивание.

### КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА 17-КЕТОГРУППУ

#### Принцип

17-кетостероиды, взаимодействуя в щелочной среде с п-динитробензолом, образуют окрашенные продукты конденсации вишнево-красного цвета.

#### Материал исследования

Спиртовый или масляный раствор фолликулина

#### Проведение анализа

В пробирку вносят 5 капель раствора фолликулина и добавляют по 5 капель раствора NaOH и п-динитробензола. Перемешивают. Развивается вишнево-красное окрашивание.

#### Оформление работы

Записывают принцип методов. Результаты оформляют в виде таблицы:

Гормон	Химическая природа	Качественная реакция	Результаты

## ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ГОРМОНОВ

Широкий диапазон влияния, способность регулировать основные, определяющие процессы в жизнедеятельности организма, обусловили широкое использование гормонов и гормоноидов в практической медицине не только при заболеваниях, вызванных гормональной недостаточностью (заместительная терапия), но и при заболеваниях, связанных с различными нарушениями обмена веществ различной этиологии. Для лечения

этих заболеваний выпускается масса гормональных препаратов и их синтетических аналогов.

В лечебной практике используется тироксин в виде препарата тиреоидина и триодтиронида гидрохлорида при гипофункции щитовидной железы. Как антигипотиреоидный препарат применяются мерказолил при гиперфункции щитовидной железы (при диффузионном токсическом зобе).

При сахарном диабете с успехом применяется инсулин для инъекций, а также его препараты пролонгированного действия суспензия цинк - инсулина аморфного, протамин - цинк - инсулина и др. Применяются также суинсулин, инсулин Б.

Для предупреждения тетании, обусловленной гипокальциемией при гипопаратиреозе используют препарат паратиреоидных желез - паратиреоидин для инъекций. При ряде системных заболеваний применяют гипокальциемический гормон тиреокальцитонин в виде препарата кальцитрина.

Стероидные гормоны, в основном, глюкокортикоиды – кортизон и гидрокортизон (и их синтетические аналоги – преднизолон, преднизон, метилпреднизолон, дексаметазон, синафлан, сеналар и др.) с успехом применяют для лечения различных аллергических и аутоиммунных заболеваний (ревматизма, дерматозов и др.), а также коллагенозов – заболеваний, связанных с поражением соединительной ткани, ожогов. Глазных заболеваний, где требуется использовать их противовоспалительные, десенсибилизирующие, противоаллергические, иммунодепрессивные свойства. Их иммунодепрессивное действие используется для профилактики отторжения пересаженных органов. Из минералокортикостероидов применяют дезоксикортикостероноацетат (при болезни Аддисона, а также астении, мышечной слабости и т.п.).

Мужской половой гормон, а также его синтетические аналоги – метилтестостерон, тестостерона пропионат и др., используются при половой слабости у мужчин и при злокачественных опухолях грудной железы у женщин. Женские половые гормоны в виде препаратов эстрогена, эстрадиола и др., а также их синтетические аналоги (синестрол, метилэстрадиол, диэтилстильбэстрол) используются при заболеваниях, связанных с недостаточной функцией яичников у женщин и при гипертрофии и раке предстательной железы у мужчин.

В данном случае эстрогены и андрогены выступают как природные антигормоны, конкурирующие за связывание с

рецепторами противоположного гормона: эстрогены блокируют андрогенные рецепторы, а андрогены – эстрогенные.

Гормоны желтого тела (прогестерон, прегнин и др.), полученные синтетическим путем, используют при патологических состояниях, связанных с недостаточностью желтого тела при маточных кровотечениях, выкидышах и др.

Кроме влияния на функции половой сферы, мужские половые гормоны стимулируют процессы синтеза белков. Это послужило основанием для создания ряда синтетических препаратов с выраженным влиянием на синтез белка при незначительном гонадотропном влиянии. Эти препараты (анаболические стероиды) – феноболит, ретаболит, силаболит и др. применяются в медицине при различных формах истощения и белкового голодания.

Адренокортикотропный гормон (АКТГ или кортикотропин) и кортизон благоприятно действуют при острой лейкемии (раке крови). АКТГ применяют при вторичной гипофункции коры надпочечников, используют также как противоаллергическое и противовоспалительное средство. АКТГ для усиления и удлинения срока действия применяют в виде препарата – суспензия цинк - кортикотропина.

Из гормонов передней доли гипофиза в лечебной практике используют также тиреотропин (при недостаточности функции щитовидной железы), соматотропин (при гипофизарной карликовости и др.), адипозин (при ожирении).

Кроме того, из гормонов передней доли гипофиза в медицинской практике применяют гонадотропин и пролактин. Гонадотропин хорионический и менопаузный назначают при нарушении половой функции у женщин и мужчин, а пролактин (под названием лактин) – при недостаточной секреции молока у женщин в послеродовом периоде.

Из препаратов средней и задней доли гипофиза в медицинской практике используют интермедин, а окситоцин, дезаминокситоцин, гифотоцин и питуитрин применяют в акушерской практике для усиления сокращения матки. Маммофизин назначают при послеродовых маточных кровотечениях и для стимулирования лактации, адиуректин – при несахарном мочеизнурении и ночном недержании мочи как антидиуретик. В качестве препарата нашел применение и соматостатин - пептид – регулятор гипоталамуса. Он используется для лечения сахарного диабета, так как ингибирует (тормозит) действие эндогенного соматотропина гипофиза на

образование и секрецию глюкагона поджелудочной железы. Повышению активности иммунной системы способствуют препараты гормонов тимуса (тимозин и др.).

Гормоноиды (серотонин, гистамин) и вещества, влияющие на их биосинтез, наряду с тиреотропными гормонами и инсулином, находят применение при лечении психических заболеваний.

### **ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ПО РАЗДЕЛУ «ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ»**

1. СТЕРОИДАМИ ПО ХИМИЧЕСКОЙ ПРИРОДЕ ЯВЛЯЮТСЯ ГОРМОНЫ:
  - 1) норадреналин
  - 2) вазопрессин
  - 3) гастрин
  - 4) эстрон
  - 5) тестостерон
2. ПРОИЗВОДНЫМИ АМИНОКИСЛОТЫ ТИРОЗИНА ПО ХИМИЧЕСКОЙ ПРИРОДЕ ЯВЛЯЮТСЯ:
  - 1) адреналин
  - 2) норадреналин
  - 3) кортикостерон
  - 4) трийодтиронин
  - 5) серотонин
3. АРАХИДОНОВАЯ КИСЛОТА ЯВЛЯЕТСЯ СИНТЕТИЧЕСКИМ ПРЕДШЕСТВЕННИКОМ В ОБРАЗОВАНИИ:
  - 1) пролактина
  - 2) простагландинов
  - 3) соматостатина
  - 4) секретина
4. ОСТРОВКОВАЯ ТКАНЬ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРОДУЦИРУЕТ ГОРМОН:
  - 1) вазопрессин
  - 2) глюкагон
  - 3) инсулин
  - 4) окситоцин
5. В РЕГУЛЯЦИИ ОБМЕНА ЭЛЕКТРОЛИТОВ ПРИНИМАЕТ УЧАСТИЕ ГОРМОН:
  - 1) тироксин
  - 2) инсулин
  - 3) альдостерон



- 4) кортикостерон
  - 5) глюкагон
6. В РЕГУЛЯЦИИ ФОСФОРНО-КАЛЬЦИЕВОГО ОБМЕНА УЧАСТВУЮТ ГОРМОНЫ:
- 1) паратгормон
  - 2) кальцитонин
  - 3) адренкортикотропин
  - 4) тестостерон
  - 5) прогестерон
7. В РЕГУЛЯЦИИ ВОДНОГО БАЛАНСА И ОСМОТИЧЕСКОГО ДАВЛЕНИЯ ПЛАЗМЫ КРОВИ, А ТАКЖЕ СТИМУЛЯЦИИ СОКРАЩЕНИЯ ГЛАДКИХ МЫШЦ УЧАСТВУЕТ ГОРМОН:
- 1) пролактин
  - 2) соматостатин
  - 3) кортиколиберин
  - 4) вазопрессин
8. АКТИВНОСТЬ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ СТИМУЛИРУЮТ ГОРМОНЫ:
- 1) адреналин
  - 2) глюкагон
  - 3) тестостерон
  - 4) инсулин
  - 5) андростерон
9. ПЕПТИДНЫЕ ГОРМОНЫ СИНТЕЗИРУЮТСЯ:
- 1) в паращитовидной железе
  - 2) в поджелудочной железе
  - 3) в щитовидной железе
  - 4) яичниках
  - 5) в коре надпочечников
10. ПРИ АТРОФИИ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ ВОЗНИКАЕТ ЗАБОЛЕВАНИЕ:
- 1) кретинизм
  - 2) микседема
  - 3) ксерофтальмия
  - 4) болезнь Аддисона
  - 5) тетания
11. ГОРМОНЫ СТЕРОИДНОЙ ПРИРОДЫ СИНТЕЗИРУЮТСЯ:
- 1) в щитовидной железе
  - 2) в поджелудочной железе
  - 3) в семенниках
  - 4) в мозговом веществе надпочечников

- 5) в коре надпочечников
12. ФУНКЦИЮ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ РЕГУЛИРУЕТ ГОРМОН:
- 1) тиреолиберин
  - 2) кальцитонин
  - 3) тиреотропин
  - 4) тироксин
13. РАСПАД ГЛИКОГЕНА В ПЕЧЕНИ СТИМУЛИРУЕТ ГОРМОН:
- 1) норадреналин
  - 2) глюкагон
  - 3) инсулин
  - 4) адреналин
  - 5) эстрадиол
14. УСИЛЕНИЕ АНАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ И СТИМУЛЯЦИЮ БИОСИНТЕЗА ГЛИКОГЕНА ОБЕСПЕЧИВАЕТ ГОРМОН:
- 1) адреналин
  - 2) норадреналин
  - 3) холецистокинин
  - 4) инсулин
  - 5) тироксин
15. БИОСИНТЕЗ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ В КОРЕ НАДПОЧЕЧНИКОВ СТИМУЛИРУЕТ ГОРМОН:
- 1) адренокортикотропин
  - 2) тиреотропин
  - 3) кортиколиберин
  - 4) кортикостерон
16. ЛИПОЛИЗ В ЖИРОВОЙ ТКАНИ СТИМУЛИРУЕТ ГОРМОН:
- 1) адреналин
  - 2) инсулин
  - 3) альдостерон
  - 4) вазопрессин
17. СКОРОСТЬ ПОСТУПЛЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ В КЛЕТКИ МЫШЦ И ЖИРОВОЙ ТКАНИ УВЕЛИЧИВАЕТ ГОРМОН:
- 1) кортизол
  - 2) глюкагон
  - 3) инсулин
18. КАТАБОЛИЗМ СПЕЦИФИЧЕСКИХ БЕЛКОВ В ЛИМФОИДНОЙ И СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ УСИЛИВАЮТ ГОРМОНЫ:
- 1) глюкокортикоиды
  - 2) минералокортикоиды
  - 3) половых желез

## 4) щитовидной железы

**СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ ПО РАЗДЕЛУ  
«ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ»**

1. Больной жалуется на неутолимую жажду, употребление большого объема жидкости, значительное количество мочи (6-8 л в сутки). При обследовании найдено глюкозы в крови 5,2 ммоль/л, кетоновых тел нет. Моча бесцветная, плотность 1,002, сахара нет. Назовите возможные причины полиурии.
2. Врач обнаружил у больного резкое снижение веса тела, повышенную раздражительность, небольшое повышение температуры по вечерам, пучеглазие (экзофтальм), повышение общего обмена, увеличение поглощения кислорода, гипергликемию, гиперазотемию. О заболевании какой эндокринной железы можно думать?
3. При обследовании мальчика 5 лет врач отметил значительное отставание умственного развития, роста. Ребенок малоактивен. В крови содержание холестерина снижено. Общий обмен понижен. О гипо – или гиперфункции щитовидной железы можно думать?
4. Больной сахарным диабетом жалуется на постоянную жажду, потребление большого количества воды (полидипсия), увеличение количества мочи (полиурия), постоянно повышенный аппетит. Объясните, почему сохраняется чувство голода, хотя потребляется большое количество пищи (полифагия), а в крови повышено содержание глюкозы?
5. Может ли переедание и ожирение способствовать развитию сахарного диабета?
6. Человек на улице потерял сознание. В приемном покое больницы отметили слабые судороги, запаха ацетона нет, сахар крови 1,66 ммоль/л, кетоновых тел и сахара в моче нет. Какая может быть причина потери сознания? Какую первую помощь нужно оказать?

## РАЗДЕЛ 13. БИОХИМИЯ КРОВИ

### ТЕМА 13.1. АЗОТСОДЕРЖАЩИЕ ВЕЩЕСТВА КРОВИ: БЕЛКИ, ФЕРМЕНТЫ, ФРАКЦИИ ОСТАТОЧНОГО АЗОТА

#### *Актуальность*

Существует тесная взаимосвязь крови со всеми тканями организма. Исследование химических компонентов крови, различных по происхождению и роли в обмене, позволяет диагностировать нарушения метаболизма в организме, следить за развитием патологического процесса и оценивать эффективность терапевтических мероприятий.

#### *Цель*

Освоение методов определения азотсодержащих веществ крови: белков, их фракций, а также остаточного азота.

#### *Вопросы для самоподготовки*

1. Назовите физико-химические характеристики крови (плотность, рН, осмотическое давление) и механизмы их сохранения на постоянном уровне.
2. Назовите составные компоненты крови: клеточные элементы, сыворотка, плазма, их биохимические особенности.
3. Укажите химический состав крови: органические соединения (основные группы) и минеральные компоненты.
4. Назовите состав азотсодержащих веществ крови: белки, ферменты, небелковые азотсодержащие соединения.
5. Укажите происхождение ферментов крови, индикаторные ферменты. Что называют энзимодиагностикой?
6. Назовите понятие «остаточный азот крови». Укажите фракции остаточного азота, их происхождение, роль в обмене, диагностическое значение определения остаточного азота.
7. Какое состояние называют азотемией? Укажите дифференцировку азотемий по биохимическим показателям.
8. Назовите происхождение, содержание, состав, функции белков крови.
9. Охарактеризуйте основные белковые фракции сыворотки крови, разделяемые электрофорезом. Укажите примеры электрофореграмм здорового человека.
10. Какое состояние называют диспротеинемией? Укажите характер изменения состава белков крови по примерам патологических

состояний в случае нефроза, цирроза печени, белкового голодания, миеломной болезни, острой инфекции.

11. Назовите диагностическое значение определения показателя общего белка крови.
12. Укажите характеристику основных методов количественного определения белка сыворотки и его фракций.

Составьте таблицу индивидуальных белков крови:

Альбумины	$\alpha_1$ -глобулины	$\alpha_2$ -глобулины	$\beta$ -глобулины	$\gamma$ -глобулины

Определите показатели крови, по которым можно оценивать состояние:

Липидного обмена	
Белкового обмена	
Водно-солевого обмена	
Эндокринные заболевания	

### Лабораторная работа 1

#### Определение активности щелочной фосфатазы

Фосфатазы катализируют гидролиз органических эфиров фосфорной кислоты: фосфоэтаноламин, пирофосфаты, пиридоксаль-5-фосфат,  $\beta$ -глицерофосфат. Щелочная фосфатаза (фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты, КФ 3.1.3.1.) Наиболее высокая активность обнаружена в эпителии тонкого кишечника, канальцев почек, предстательной и молочной железах, в остеобластах, плаценте.

Щелочная фосфатаза – негомогенный фермент, различают 5 тканеспецифичных изоферментов: почечный, костный, кишечный, плацентарный, печеночный. Фракции фермента отличаются по своим каталитическим свойствам, электрофоретической подвижности, устойчивости к тепловой инактивации. Энзим образует комплексы с белками и липидами крови.

#### *Принцип*

Щелочная фосфатаза сыворотки крови гидролизует субстрат 4-нитрофенилфосфат с образованием 4-нитрофенола, дающего в щелочной среде желтое окрашивание. Интенсивность окраски пропорциональна активности фермента и определяется колориметрически после остановки ферментативной реакции ингибитором.

**Материал исследования**

Сыворотка крови

**Реактивы**

Набор реактивов «Био-Ла-тест».

**Проведение анализа**

	<b>ОПЫТ, мл</b>	<b>КОНТРОЛЬ, мл</b>
Раствор 2 (буфер)	1,0	1,0
Сыворотка крови	0,02	–
Инкубировать 5 мин при 37°C. Охладить.		
Раствор 1 (субстрат)	0,2	0,2
Инкубировать 10 мин при 37°C.		
Раствор ингибитора	0,5	0,5
Раствор 3 (стандарт)	–	0,02
Перемешивают и измеряют оптическую плотность пробы и контрольного раствора против воды при длине волны 400-420 нм.		

**Расчет**

Активность фермента находят по формуле

$$\text{Активность ЩФ, мккат/л} = 10,263 \times (E_{\text{ОПЫТ}} - E_{\text{КОНТРОЛЬ}})$$

где  $E_{\text{ОПЫТ}}$  – оптическая плотность опытной пробы,  $E_{\text{КОНТРОЛЬ}}$  – оптическая плотность контрольной пробы.

**Нормальные величины**

Сыворотка крови                    278-830 ммоль/с-л  
     или        0,90-2,29 мккат/л  
     или        0,02-0,05 МЕ

**Клинико-диагностическое значение**

Повышение активности фермента встречается при заболеваниях печени, сопровождающихся явлениями холестаза: механическая желтуха (5-10-кратное повышение уровня), холангит и холангиолит, инфекционный мононуклеоз, лимфогранулематоз с поражением костей, при вирусном гепатите активность фермента остается нормальной или умеренно повышается, цирроз печени (с лимфой проникает ЩФ тонкого кишечника), больших величин активность энзима достигает при острой желтой дистрофии печени.

Рост активности ЩФ наблюдается при костных заболеваниях: метастазы рака в кости, миеломная болезнь, остеогенная саркома, болезнь Педжета – деформирующее поражение кости (выше нормы в 20 раз и более). Гиперферментемия определяется также при рахите, размягчении костной ткани, может быть при остеопорозах, переломах, доброкачественных костных опухолях. При

заболеваниях почек увеличение активности фермента связано с нарушением метаболизма витамина D и вторичным гиперпаратиреозом.

#### *Оформление работы*

В отчете записывают принцип метода, отмечают нормальные величины, регистрируют результаты и делают вывод.

### Лабораторная работа 2 **Количественный метод определения остаточного азота крови по методу Асселя**

Остаточный азот сыворотки составляют низкомолекулярные азотсодержащие вещества, оставшиеся в фильтрате после осаждения белков. Основными фракциями остаточного азота являются мочевины (примерно 50%), аминокислоты (около 25%), креатин и креатинин (7,5%), полипептиды, нуклеотиды и азотистые основания (5%), мочевая кислота (4%), аммиак и индикан (0,5%) и другие (билирубин, холин).

Для клинических наблюдений более информативным является определение отдельных азотистых фракций.

#### *Принцип*

Сжигание небелкового фильтрата с концентрированной серной кислотой дает переход азота органических веществ в сульфат аммония, который с реактивом Несслера образует продукты желто-оранжевого цвета. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации азота.

#### *Материал исследования: цельная кровь*

#### *Реактивы*

1) 10% трихлоруксусная кислота, 2) перекись водорода, 3) 30% раствор и концентрированная  $H_2SO_4$ , 4) реактив Несслера (щелочной раствор йодистых солей ртути и калия), 5) 26 ммоль/л стандартный раствор  $(NH_4)_2 SO_4$ , 6) 5% раствор NaOH, 7) лакмус.

#### *Оборудование*

Колбы Кьельдаля, песчаная баня, ФЭК

#### *Проведение анализа*

1. Подготовительный этап.

Этот этап выполняет лаборант. Студенты получают минерализат и продолжают работу.

Осаждение белков: в центрифужную пробирку, содержащую 1,8 мл дистиллированной воды, вносят 0,2 мл крови, приливают 1,0 мл

10% ТХУ, центрифугируют (фильтруют через смоченный бумажный фильтр).

Минерализация: 1,0 мл надосадка переносят в термостойкую пробирку, приливают 3 капли концентрированной  $H_2SO_4$ , 3 капли  $H_2O_2$ . Осторожно упаривают и нагревают до получения бесцветного минерализата.

## 2. Цветная реакция

	ОПЫТ, мл	СТАНДАРТ, мл
Минерализат	1,0	–
Стандартный раствор	–	1,0
Раствор NaOH	Добавляют до нейтрализации кислоты. Величину pH проверяют по лакмусовой бумажке – в нейтральной среде окраска переходит в синий. Излишек щелочи вызывает помутнение раствора.	
Дистилл. вода	8,0	8,0
Реактив Несслера	2,0	2,0
	Колориметрируют на ФЭК при 610-640 нм, красный светофильтр.	

### Расчет

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

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

### Нормальные величины

Сыворотка 14-28 ммоль/л

### Клинико-диагностическое значение

Остаточный азот является важным показателем состояния белкового обмена. Увеличение фракций остаточного азота (азотемия) по своему характеру может быть абсолютным, связанным с действительным накоплением азотистых компонентов в крови, и относительным, связанным с дегидратацией. В свою очередь, абсолютная азотемия может быть ретенционная (почечного происхождения) и продукционная. Ретенционная возникает в результате задержки выведения и различается на азотемию почечного происхождения (заболевания клубочков – нефриты, туберкулез почек, нефросклероз и др) и внепочечного происхождения. Внепочечные, в свою очередь, подразделяются на надпочечные (результат нарушения гемодинамики и падения филь-



традиционного давления при сердечно-сосудистой недостаточности, снижении артериального давления) и подпочечные (при гипертрофии или аденоме простаты, почечнокаменной болезни). Продукционная азотемия выявляется при всех состояниях, связанных с увеличением распада белков, от ретенционной ее отличает повышение содержания аминокислот в крови, а также одновременное накопление азотистых компонентов в крови и моче.

#### *Оформление работы*

Записывают принцип метода. Фиксируют результаты, делают вывод.

### Лабораторная работа 3 **Рефрактометрический метод определения белка в сыворотке крови**

#### *Принцип*

В основе метода лежит неодинаковая способность различных сред преломлять проходящие через них лучи. При переходе из одной прозрачной среды (стекло) в другую (сыворотка крови) под наклоном к поверхности раздела двух фаз луч света преломляется. При этом отношение синуса угла падения к синусу угла преломления называется коэффициентом преломления (рефракции). В сыворотке крови величина рефракции зависит от количества и состава белков.

*Материал исследования:* сыворотка крови

*Оборудование:* рефрактометр

#### *Проведение анализа*

1. Проверяют нулевую точку прибора путем определения показателя преломления дистиллированной воды. Для этого на чистую поверхность измерительной призмы капают 2-3 капли воды и опускают осветительную призму. Наводят окуляр на резкость. Поворотом рефрактометра к свету добиваются наилучшей освещенности шкалы и штриха. Вращением маховичка "И" границу светотени вводят в поле зрения окуляра. Вращают маховичок компенсатора "К" до исчезновения окраски границы светотеней. Наблюдая в окуляр, маховичком "И" наводят границу светотени точно на линию штриха. Снимите отсчет по шкале. Показатель преломления дистиллированной воды равен 1,333.

2. Измерение показателя преломления сыворотки крови проводят аналогичным образом.

3. После проведения измерений поверхности призм очистить мягкой салфеткой.

*Расчет*

Зная показатель преломления, расчет проводят по таблице:

Показатель преломления	Концентрация белка в сыворотке крови, г/л
1,34500	52,5
1,34557	54,7
1,34575	56,8
1,34612	59,0
1,34650	61,2
1,34687	63,4
1,34724	65,5
1,34761	67,7
1,34798	69,8
1,34836	72,0
1,34870	74,2
1,34910	76,3
1,34947	78,5
1,34984	80,6
1,35021	82,8

*Нормальные величины*

Сыворотка крови

дети

новорожденные 52-91 г/л

до 3 лет 54-85 г/л

взрослые 65-85 г/л

Моча 10-140 мг/л

*Клинико-диагностическое значение определения общего белка сыворотки*

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

Истинная (абсолютная) гипопроотеинемия связана:

- с недостаточным потреблением белка с пищей (заболевания желудочно-кишечного тракта, сужение пищевода (опухоли), недоедание, голодание);

- со снижением синтеза белка (несбалансированный аминокислотный состав пищи, хронические паренхиматозные гепатиты, интоксикации, злокачественные новообразования, лечение кортикостероидами);
- с усиленным распадом (кахексия, тяжелые инфекции, длительные воспалительные процессы, лихорадочные состояния, тиреотоксикозы);
- с потерей белка (нарушения проницаемости капиллярных стенок, кровоизлияния, ожоги, острые и хронические кровотечения, нефротический синдром и гломерулонефриты).

Истинная гиперпротеинемия встречается при острых инфекциях (увеличение синтеза белков острой фазы), при хронических (за счет  $\gamma$ -глобулинемии), при миеломной болезни, лимфогрануломатозе, саркоидозе.

Относительная гипопропротеинемия связана с нарушением водного баланса – гипергидратация и потерей белка (нефротический синдром). Гипопропротеинемия чаще всего связана с уменьшением фракции альбуминов крови.

Относительная гиперпротеинемия вызывается потерями внутрисосудистой жидкости в результате профузных поносов (например, холере), усиленном потоотделении, неукротимой рвоте, несахарном диабете, тяжелых и обширных ожогах, генерализованных перитонитах.

#### Лабораторная работа 4 Метод электрофоретического разделения белков на бумаге (демонстрация)

##### *Принцип*

Коллоидные частицы белка перемещаются в электрическом поле постоянного тока: в щелочной среде к аноду, в кислой – к катоду. В щелочной среде наиболее быстро перемещаются альбумины,  $\alpha_1$ - и  $\alpha_2$ - и  $\beta$ -глобулины.

##### *Реактивы*

1) Веронал-мединаловый буфер, pH=8,6: 10,32 г мединала и 1,84 г веронала растворяют в дистиллированной воде при нагревании, объем доводят до 1 л. 2) Краситель бромфеноловый синий: 0,5 г красителя растворяют в смеси 10 мл ледяной уксусной кислоты и 90 мл дистиллированной воды. 3) Отмывочный раствор:

2 мл ледяной уксусной кислоты и 98 мл дистиллированной воды.

4) Элюирующий раствор: 0,01M NaOH.

#### *Оборудование*

Прибор для электрофореза на бумаге, фотоэлектроколориметр или денситометр.

#### *Проведение анализа*

1) Подготовка камеры: камеру для электрофореза устанавливают строго горизонтально. Кюветы прибора заполняют буферным раствором.

2) Подготовка бумаги: специальную хроматографическую бумагу нарезают таким образом, чтобы волокна целлюлозы шли вдоль полосок, полоски смачивают буферным раствором и слегка отжимают между листами фильтровальной бумаги, помещают полосы в камеру таким образом, чтобы концы их были погружены в буферный раствор, заполняющий кюветы;

3) Нанесение образцов: распределение сыворотки должно быть равномерным по линии старта: на нижний край шлифовального, предметного или покровного стекла наносят 0,01 мл негемолизированной сыворотки и касаются стеклом линии старта;

4) Проведение электрофореза: сила тока зависит от величины подаваемого напряжения, типа и pH буферного раствора, толщины бумаги и температуры. Длительность электрофореза составляет от 6 до 24 часов и подбирается индивидуально в каждом конкретном случае.

5) Высушивание бумажных полос в сушильном шкафу при +95+105°C в течение 10-15 мин.

6) Окрашивание раствором бромфенолового синего в течение 30 минут. Отмывают несколькими порциями отмывочного раствора для удаления не связанной с белком краски до просветления фона и высушивают в темном месте при комнатной температуре на фильтровальной бумаге.

7) Элюирование: извлечение краски из бумаги. Для этого кусочки полос, нарезанные на отдельно содержащие фракции белков, вырезают и помещают в пробирки, куда вносят 0,01M NaOH. В пробирки с глобулиновыми фракциями приливают по 3 мл элюирующего раствора, с альбуминовой – 9 мл. Контролем служит участок фореграмм, не содержащий белка.

8) Измерение и расчет: измерение экстинкции окрашенных растворов проводят на ФЭКе (560 нм, кювета 1 см). Величину экстинкции альбуминов умножают на 3.

а) результат выражают в процентах от суммы экстинкций всех фракций, принятой за 100%.

б) предварительно определив содержание общего белка (биуретовым методом или с помощью рефрактометра) в образце, рассчитывают содержание белковых фракций в г/л.

## **ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МЕТОДОВ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ БЕЛКОВ**

Снижение содержания альбуминовой фракции происходит при состояниях, характеризующихся:

- пониженным синтезом или повышенным катаболизмом; врожденной анальбуминемией, белковым голоданием, нарушением всасывания, тяжелыми поражениями печени (цирроз, дистрофии, некроз, активный гепатит, амилоидоз печени), лихорадкой, кахексией, тяжелыми инфекциями, панкреатитом, коллагенозами, тиреотоксикозом, болезнью Иценко-Кушинга (гипофункция надпочечников).
- потерей альбумина через кожу, почки, желудочно-кишечный тракт.
- воспалительными процессами, обусловленными выходом альбумина из кровотока в межклеточное пространство. Концентрация альбумина  $<20$  г/л сопровождается отеками.

Повышение  $\alpha_1$ - и  $\alpha_2$ -глобулиновой фракции связано с острыми и подострыми воспалительными процессами и некоторыми злокачественными опухолями, травмами, т.к. сюда входит большинство белков острой фазы (С-реактивный белок,  $\alpha_2$ -макроглобулин,  $\alpha_1$ -гликопротеин,  $\alpha_1$ -антитрипсин, церулоплазмин, гаптоглобин). Большая часть белков  $\beta$ -глобулиновой фракции является  $\beta$ -липопротеинами, поэтому повышение этой фракции чаще всего связано с гиперлипопротеинемиями. Кроме того, влияние на динамику этой фракции оказывают трансферрин, гемопексин, компоненты системы комплемента. Фракция  $\gamma$ -глобулинов увеличивается при патологических состояниях, связанных с хроническими воспалительными процессами, т.к. содержит иммуноглобулины G, A и M.

В клинической практике для сыворотки выделяют 9 типов протеинограмм, соответствующих различным патологическим состояниям:

1 тип – соответствует острым воспалительным процессам. Характеризуется значительным уменьшением содержания

альбуминов и большей выраженностью фракций  $\alpha_1$ - и  $\alpha_2$ -глобулинов; в поздние стадии заболевания обычно отмечается увеличение  $\gamma$ -глобулинов. Этот тип протеинограмм свойствен начальным стадиям пневмоний, острым полиартритам, экссудативному туберкулезу легких, острым инфекционным заболеваниям, сепсису, обширному инфаркту миокарда.

2 тип – характерен для хронического воспаления. Отличается умеренным уменьшением фракции альбуминов и выраженным увеличением уровня  $\alpha_2$ - и  $\gamma$ -глобулинов. Этот тип электрофореграмм соответствует поздней стадии пневмоний, хронического туберкулеза легких, хронического эндокардита, холецистита, цистита и пиелита.

3 тип – отражает нарушение функций почечного фильтра. Характеризуется значительным уменьшением содержания альбуминов, повышением концентрации  $\alpha_2$  и  $\beta$ -глобулинов при умеренном снижении уровня  $\gamma$ -глобулинов. Этот тип электрофореграмм свойствен липоидному или амилоидному нефрозам, нефритам, нефросклерозу, токсикозам беременности, терминальным стадиям туберкулеза легких, кахексиям и ряду других заболеваний.

4 тип – соответствует злокачественным новообразованиям. Обнаруживается резкое снижение содержания альбуминов при значительном увеличении всех глобулиновых фракций. Наиболее высокого подъема достигает уровень  $\beta$ -глобулинов. Этот тип протеинограмм сопровождает метастатические новообразования с различной локализацией первичной опухоли.

5 тип – характерен для  $\gamma$ -глобулиновых плазмоцитом. Отличается значительным уменьшением концентрации альбуминов,  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобулинов при увеличении содержания  $\gamma$ -глобулинов. Он типичен для  $\gamma$ -плазмоцитом, макроглобулинемии и некоторых ретикулезозов.

6 тип – свойствен  $\beta$ -глобулиновым плазмоцитомам. Обнаруживается уменьшением уровня альбуминов и большинства глобулиновых фракций, лишь фракция  $\beta$ -глобулинов претерпевает резкое избирательное увеличение. Данный тип электрофореграмм присущ  $\beta_1$ -плазмоцитомам,  $\beta_1$ -плазмноклеточной лейкемии и макроглобулинемии Вальденштрема.

7 тип – характерен для гепатитов. Отражает умеренное уменьшение содержания альбумина, увеличение уровня  $\gamma$ -глобулинов и менее выраженное –  $\beta$ -глобулинов. Этот тип электрофореграмм встречается при состояниях с последствиями

токсического повреждения печени, гепатитах, гемолитических процессах, лейкомиях, злокачественных новообразованиях кроветворного и лимфатического аппарата, некоторых формах полиартрита, дерматозах.

8 тип – соответствует некрозу печени. Отмечается значительное снижение альбуминов при сильном повышении  $\gamma$ -глобулиновой фракции, основание которой на денситограмме расширяется. Указанный тип протеинограмм выявляется при циррозах печени, тяжелых формах индуративного туберкулеза легких, при некоторых формах хронического полиартрита и коллагенозов.

9 тип – характерен для механической желтухи. Отличается комплексом изменений, состоящих в уменьшении уровня альбуминов и умеренном увеличении содержания  $\alpha_2$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -глобулинов. Этот тип электрофореграмм присущ обтурационной желтухе, а также желтухам, вызванных развитием рака желчевыводящих путей и головки поджелудочной железы.

Парапротеины (параиммуноглобулины) не обнаруживаются в крови здоровых людей. Они не обладают свойствами антител, но по химической структуре близки к нормальным иммуноглобулинам, «патологическими двойниками» которых их обычно считают. Очень вероятно, что парапротеины вырабатываются специальными клонами клеток. Обычно это патологические варианты Ig G, реже других классов. На электрофореграмме сыворотки они располагаются в виде узкой интенсивно окрашенной полосы между  $\gamma$ - и  $\beta$ -глобулиновыми фракциями (M-градиент) (при миеломной болезни) или попадают во фракцию  $\gamma$ -глобулинов – гипергаммаглобулинемия реактивного характера (ревматоидный артрит, опухоли). Группа заболеваний, при которых в крови обнаруживаются парапротеины, еще недостаточно хорошо изучена. Наиболее известна миеломная болезнь (плазмоцитома) и макроглобулинемия Вальденштрема. В последнем случае в плазме присутствуют очень крупные молекулы парапротеинов относительной молекулярной массы до 1 000 000 Д.

Сюда же примыкают «болезнь иммунных комплексов» и криоглобулинемии. Особый вид парапротеинов – белок Бенс-Джонса обнаруживают в моче при миеломной болезни. Его характерная особенность в том, что он выпадает в осадок при температуре мочи 40-60°C и при дальнейшем нагревании до 85-100°C снова растворяется.

*Индивидуальные представители белковых фракций крови*

Альбумины	Глобулины			
	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\beta$	$\gamma$
Преальбумины Постальбумины Альбумин	$\alpha_1$ -липопротеин $\alpha_1$ -кислый протеин (серомукоид) $\alpha_1$ -гликопротеин транскортин протромбин антиплазмин антитрипсин витамин В <sub>12</sub> -связывающий белок	Гаптоглобин (Нр-1,1, Нр-1-2, Нр-2-2) церулоплазмин $\alpha_2$ -липопротеин $\alpha_2$ -НС-гликопротеин $\alpha_2$ -М-глобулин холинэстераза щелочная фосфатаза проакцелерин фактор Кристмаса С-реактивный белок	$\beta_1$ А-глобулин $\beta$ -липопротеин $\beta_1$ В-глобулин трансферрин плазминоген проконвертин фибриноген щелочные комплексы С <sub>1</sub> -С <sub>4</sub> гемопексин	G-иммуноглобулин А-иммуноглобулин D-иммуноглобулин Е- иммуноглобулин

**КОМПЛЕКСНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВ ОСТРОЙ ФАЗЫ**

Белки острой фазы – это группа белков, отражающих острый период многих заболеваний. Их концентрация возрастает каждый раз когда имеет место воспаление в результате инфекции, аллергии или деструкции. Большинство из них входят в  $\alpha$ -глобулиновую фракцию. Многие являются ингибиторами протеиназ, тем самым влияя на антипротеолитическую функцию крови. Кроме того, эти белки богаты углеводами (отсюда их другое название – сывороточные мукопротеины, серомукоиды или  $\alpha$ -гликопротеины), что определяет их соединительно-тканное происхождение. Поэтому по количеству белков острой фазы можно судить о состоянии соединительной ткани: при ее деструкции уровень белков возрастает.



Название белка	Место синтеза	Функция	Нормальное содержание	Клинико-диагностическое значение	
				Факторы, повышающие уровень	Факторы, снижающие уровень
Кислый $\alpha_1$ -гликопротеин (орозомукоид) – Обладает кислыми свойствами и содержит высокий процент углеводов	Печень	Связывает лекарства, стероиды. Ингибитор агрегации тромбоцитов.	М: 0,5-1,3 г/л (ср.0,85) Ж: 0,4-1,2 г/л (ср.0,70)	Острое инфекционное воспаление, острая малярия, прием эстрогенов, миелома, инфаркт миокарда, лимфогрануломатозы, системные ревматоидные заболевания.	Беременность, нефротический синдром
$\alpha_1$ -антитрипсин ( $\alpha_1$ -протеиназный ингибитор),	Печень	Составляет 92-94% от общей антипротеолитической функции крови. Угнетает активность трипсина, химотрипсина, калликрейна, плазмина, ингибитор лейкоцитарной эластазы.	1,4-3,2 г/л (ср.2,2 )	Острые инфекции и воспаление, острая малярия, беременность, лечение анаболическими стероидами, злокачественные новообразования.	Наследственная недостаточность, ювенильный цирроз, эмфизема легких.
Альбумин	Печень	Коллоидно-	37-53 г/л	Острое	Большие потери

Название белка	Место синтеза	Функция	Нормальное содержание	Клинико-диагностическое значение	
				Факторы, повышающие уровень	Факторы, снижающие уровень
		осмотическая регуляция, резервный белок. Транспорт катионов, жирных кислот, витамина С, лекарств, гормонов щитовидной железы.	(ср.44)	обезвоживание, прием анаболических стероидов	белка: кровотечение, болезни почек, ожоги, шок. Нарушение синтеза альбумина при циррозе печени. Увеличение скорости его распада, гиперкортицизм.
С-реактивный белок (СРБ)		Активация классического пути комплемента, иммунных реакций, ингибитор агрегации тромбоцитов, связывает липиды, углеводы, участвует в работе каталазы.	нет или следы <0,05 г/л	Острые и хронические инфекции, острая малярия, некроз, хроническая почечная недостаточность, инфаркт миокарда, ревматоидный артрит, подагра.	

Название белка	Место синтеза	Функция	Нормальное содержание	Клинико-диагностическое значение	
				Факторы, повышающие уровень	Факторы, снижающие уровень
Фибриноген	Печень	Белок свертывания крови	В плазме 2,4 -4,0 г/л (ср.3,0)	Острые воспалительные процессы. Сердечно-сосудистые заболевания (атеросклероз)	Наследственная недостаточность. Гиперфибринолиз (ДВС-синдром)
$\alpha$ 2-макроглобулин – высокомолекулярный цинксодержащий белок (M=725000 Д), содержит 4 идентичных субъединицы и включает углеводный компонент	Печень	Транспортирует ферменты и гормоны, рецептор лимфоцитов, участвует во взаимодействии матери и плода, оказывает иммуномодулирующее действие, ингибитор компоненты комплемента.	М: 1,2-2,7 г/л (ср.1,7) Ж: 1,4-3,2 г/л (ср.2,0)	Нефротический синдром, беременность, заболевания печени, сахарный диабет, бронхопневмония, врожденные пороки сердца.	Фибринолиз, острый панкреатит, почечно-каменная болезнь, опухоли печени, инфаркт миокарда, язвы желудка и 12-перстной кишки.
Гаптоглобин Представлен 3 генетически		Связывает гемоглобин и катепсины,	1,0-2,3 г/л (ср.1,7 г/л)	Системные ревматоидные заболевания,	Гемолитическая анемия, заболевания

Название белка	Место синтеза	Функция	Нормальное содержание	Клинико-диагностическое значение	
				Факторы, повышающие уровень	Факторы, снижающие уровень
обусловленными формами Hp1-1, Hp2-1, Hp2-2.		транспортирует витамин В12.		нефротический синдром, туберкулез.	печени, наследственная недостаточность, острая малярия.
Трансферрин		Транспортирует железо, обладает бактериостатическим действием.	2,0-4,0 г/л (ср.2,35 г/л)	Недостаток железа, беременность, прием эстрогенов, липоидный нефроз.	Наследственная недостаточность синтеза, прием тестостерона, нефрозы, малярия, гемохроматоз, недоедание, опухоли.
Церулоплазмин – медьсодержащий белок.		Регулирует обмен меди, обладает ферриоксидазной активностью	0,15-0,5 г/л	Такие же как и у других белков острой фазы, специфично при меланоме, шизофрении.	Наследственная недостаточность синтеза, нефротический синдром.

## ТЕМА 13.2. ДЫХАТЕЛЬНАЯ ФУНКЦИЯ КРОВИ

### *Актуальность*

Кровь занимает особое место в обмене веществ, благодаря ряду специфических функций, принадлежащих ее химическим компонентам. Незаменима ее роль в газообмене и регуляции кислотно-основного состояния (КОС) организма, нарушения которых в клинической практике многочисленны и для их оценки требуется знание теоретического и лабораторного анализа.

### *Цель*

Освоение методов определения показателей кислотно-основного состояния.

### *Вопросы для самоподготовки:*

1. Охарактеризуйте регуляторную функцию крови, ее проявление и системы обеспечения. Что называют кислотно-основным состоянием организма? Укажите химические и физиологические механизмы поддержания гомеостаза.
2. Охарактеризуйте буферные системы - бикарбонатную (гидрокарбонатную), фосфатную, белковую, гемоглобиновую (оксигемоглобиновую). Укажите их состав, механизм поддержания постоянства pH:

Буферная система	Состав буферной системы	Механизм действия системы	
		Нейтрализация кислот	Нейтрализация оснований
1. Бикарбонатная 2. Гемоглобиновая 3. Фосфатная 4. Белковая			

1. Назовите роль Hb в поддержании кислотно-основного состояния (участие в превращении  $H_2CO_3$  в бикарбонаты).
2. Заполните и внесите в тетрадь таблицу метаболических и респираторных (газовых) сдвигов показателей кислотно-основного состояния, наблюдаемых при патологических состояниях ( $\uparrow$ -увеличение,  $\downarrow$ -снижение):

Тип нарушения		pH	pCO <sub>2</sub>	Избыток оснований	[HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]
Метаболический	Ацидоз				
	Алкалоз				
Респираторный	Ацидоз				
	Алкалоз				

3. Охарактеризуйте дыхательную функцию крови, ее проявление и механизмы обеспечения. Назовите биологический смысл транспорта газов, их связанных форм.
4. Охарактеризуйте эритроциты как главный участник транспорта газов кровью: его компоненты, обеспечивающие перевод газов в обратимо связанную форму.
5. Назовите механизм транспорта кислорода: обратимое связывание с гемоглобином, кривую насыщения Hb кислородом или диссоциации гемоглобина, биохимический смысл S-образной кривой диссоциации гемоглобина.
6. Укажите механизм транспорта углекислого газа: локализация и роль карбоангидразы, роль Hb и оксигемоглобина в реакциях связывания и освобождения угольной кислоты. Эритроцит как буфер в изменении концентрации карбонат-ионов HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> плазмы. Формы транспорта CO<sub>2</sub>.

Лабораторная работа 1  
**Определение основных показателей  
кислотно-основного состояния**

Полную лабораторную информацию о кислотно-основном состоянии, т.е. о дыхательных и метаболических компонентах крови на учебных практических занятиях получить невозможно: исследование выполняется при помощи совершенной электрохимической аппаратуры на абсолютно свежем материале (капиллярная или венозная кровь).

## Показатели кислотно-основного состояния крови

Показатель	Принятое обозначение	Характеристика и условие измерения	Нормальные величины
Актуальный рН	рН	Водородный показатель – отрицательный десятичный логарифм концентрации водородных ионов в анаэробно взятой крови при 38°C. Характеризует концентрацию $H^+$ в плазме, в эритроцитах рН всегда на 0,1 ниже	7,36-7,44
Актуальное парциальное давление углекислого газа	рСО <sub>2</sub>	Давление СО <sub>2</sub> в газовой смеси, находящейся в равновесии с плазмой артериальной крови при температуре 38°C. Отражает концентрацию углекислоты в крови, зависящей от вентиляции легких и диффузии СО <sub>2</sub> в воздух альвеол. Изменяется при нарушении дыхания и доставке углекислоты к легким.	36-44 мм рт.ст.
Актуальные бикарбонаты	АВ	Концентрация $HCO_3^-$ в крови при 38°C и реальных (данных) значениях рН и рСО <sub>2</sub> .	19-25 ммоль/л
Стандартные бикарбонаты	SB	Концентрация $HCO_3^-$ в плазме при стандартных условиях: полное насыщение кислородом крови, уравновешенной при 38°C с газовой смесью, в которой рСО <sub>2</sub> равно 40 мм рт.ст	21-25 ммоль/л
Щелочной резерв		Отражает концентрацию щелочных соединений в цельной крови, определяется титрометрически, относится к устаревшим методам	100-115
Буферные основания	ВВ	Сумма всех анионов цельной крови, обладающих буферными свойствами при условии полного насыщения крови	

Показатель	Принятое обозначение	Характеристика и условие измерения	Нормальные величины
		кислородом при 38°C. Показатель мощности буферной системы. Изменения буферных оснований отражают степень метаболических нарушений.	
Нормальные буферные основания	NBB	Сумма всех анионов цельной крови, обладающих буферными свойствами при условии полного насыщения крови кислородом, при содержании гемоглобина 140 г/л, в стандартных условиях (38°C, рН 7,38, рСО <sub>2</sub> 40 мм РТ.ст.).	
Избыток (дефицит) буферных оснований	BE	Различие между фактической величиной ВВ и их нормальным значением (BE=ВВ–NBB). Положительные значения указывают на избыток оснований, отрицательные – на дефицит оснований. Позволяет оценить величину метаболических нарушений. Предел дефицита, совместимый с жизнью, 30 ммоль/л.	±2,5 ммоль/л

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ БУФЕРНОЙ ЕМКОСТИ КРОВИ  
ТИТРОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ**

Сила буферных систем определяется их буферной емкостью, т.е. количеством молей кислоты или основания, которое необходимо добавить к буферному раствору, чтобы сместить его активную реакцию на единицу.

*Принцип*

Для определения буферной емкости сыворотки в отношении кислых продуктов ее титруют кислотой с индикатором метилоранж. Для определения буферной емкости в отношении щелочных продуктов пробу сыворотки титруют щелочью с индикатором фенолфталеин.



*Материал исследования:* сыворотка крови

*Реактивы*

1) 0,1М HCl, 2) 0,1М NaOH, 3) 0,5% раствор метилоранж, 4) 0,5% спиртовой раствор фенолфталеина

*Проведение анализа*

1. В коническую колбу вносят 1 мл сыворотки, 2-3 капли раствора метилоранжа. Так как рН сыворотки выше 4,5, то метилоранж окрашивается в желтый цвет. Сыворотку титруют из бюретки соляной кислотой до покраснения.

2. В коническую колбу вносят 1 мл сыворотки, 2-3 капли раствора фенолфталеина. Так как рН сыворотки выше 8,6, то смесь остается бесцветной. Сыворотку титруют из бюретки 0,1н NaOH до слабо-розового окрашивания.

*Расчет*

Отношение количества мл соляной кислоты, идущего на титрование, к количеству щелочи показывает резервы сыворотки крови.

*Нормальные величины*

Кислота : щелочь = 20 : 1

#### ОПРЕДЕЛЕНИЕ рН МОЧИ

*Принцип*

Определение проводится с помощью индикаторной бумаги или диагностических полосок "Альбуфан", "Тетрафан", "Гексафан", имеющих тест-зону для определения рН.

*Материал исследования:* моча

*Проведение анализа*

В анализируемую мочу погружают диагностическую полоску и немедленно вынимают. Спустя одну минуту сравнивают окраску зоны индикации с цветной шкалой сравнения на этикетке футляра.

*Нормальные величины*

рН мочи колеблется в пределах 5,0-7,0

*Влияющие факторы*

При преимущественно белковом питании реакция мочи кислая, при растительной диете – щелочная. Кислую реакцию мочи обуславливают, прежде всего, ионы  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  и  $\text{NH}_4^+$ , а щелочную –  $\text{HCO}_3^-$ .

*Практическое значение*

Резко кислая реакция мочи наблюдается при лихорадочных состояниях, сахарном диабете, голодании и т.д. Щелочная реакция

мочи отмечается при циститах и пиелитах, сильной рвоте, ведении карбоната натрия и употреблении щелочных минеральных вод. Кислотность мочи определяет возможность образования тех или иных типов мочевого камня. Мочекислые камни чаще всего образуются при pH ниже 5,5, оксалатные – при pH 5,5-6,0, фосфатные – при pH 7,0-7,8.

*Практическое значение определения показателей кислотно-основного состояния*

В соответствии с патогенезом выделяют четыре основных состояния: респираторный ацидоз и алкалоз, метаболический ацидоз и алкалоз (табл.1). Среди этих нарушений различают острые и хронические, компенсированные и декомпенсированные состояния (↑-увеличение, ↓-снижение, N – нормальные значения при компенсированных формах):

Таблица 1

Изменение показателей кислотно-основного состояния при ацидозе и алкалозе.

Тип нарушения		pH	pCO <sub>2</sub>	Избыток оснований	[HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]
Метаболический	Ацидоз	↓	↓ (или N)	↓	↓
	Алкалоз	↑	↑ (или N)	↑	↑
Респираторный	Ацидоз	↓	↑	↑ (или N)	↑ (или N)
	Алкалоз	↑	↓	↓ (или N)	↓ (или N)

Таблица 2.

Нарушения кислотно-основного состояния и причины их возникновения

Формы нарушений	Причины
<p>Ацидоз метаболический – самая частая и тяжелая форма нарушения кислотно-основного состояния. В основе его лежит накопление в организме нелетучих кислых продуктов (молочная, β-оксимасляная и ацетоуксусная кислоты).</p>	<p>избыточное образование органических кислот – декомпенсированный сахарный диабет (кетацидоз), врожденные нарушения метаболизма, голодание и гипоксия (лактацидоз), общий наркоз, отравление этанолом, метанолом, заболевания печени, легочная и сердечная недостаточность, инфекции.</p> <p>нарушения выведения кислых продуктов – при острой и хронической почечной недостаточности, сопровождающейся задержкой <math>\text{NH}_4^+</math>, <math>\text{SO}_4^{2-}</math>, <math>\text{HPO}_4^{2-}</math> ионов.</p> <p>дегидратация при рвотах, диарее, сопровождающейся потерей бикарбоната.</p> <p>Избыточное введение кислот.</p>
<p>Ацидоз респираторный – характеризуется увеличением концентрации углекислоты и повышением ее парциального давления в крови выше 50 мм рт.ст.</p>	<p>высокая концентрация <math>\text{CO}_2</math> во вдыхаемом воздухе;</p> <p>недостаточность легочной вентиляции – угнетение дыхательного центра, стеноз дыхательных путей, отеки гортани, хронический бронхит, уменьшение активной массы легких.</p>
<p>Алкалоз метаболический – состояние дефицита водородных ионов в крови в сочетании с избытком оснований. Часто сочетается со снижением калия в крови</p>	<p>потеря <math>\text{HCl}</math> при рвоте;</p> <p>потеря <math>\text{H}^+</math> в почках избыток минералокортикоидов;</p> <p>дефицит <math>\text{K}^+</math>;</p> <p>накопление бикарбонатов при передозировке нейтрализующих ацидоз препаратов.</p>
<p>Алкалоз респираторный – характеризуется снижением <math>\text{pCO}_2</math>, ниже 38 мм рт.ст. и повышением <math>\text{pH}</math> выше 7,50, при неадекватно высокой легочной вентиляции по сравнению с продукцией углекислоты в организме.</p>	<p>Возбуждение дыхательного центра – опухоль, черепно-мозговая травма, энцефалит;</p> <p>гипервентиляция при гипоксии – анемия, горная болезнь, пониженное содержание <math>\text{O}_2</math> во вдыхаемом воздухе.</p>

*Оформление работы*

Записывают принцип методов, результаты сравнивают с нормальными величинами, отмечают практическое значение работы и делают выводы по полученным результатам.

Лабораторная работа 2  
**Количественное определение неорганического  
 фосфора в сыворотке крови**

Обмен фосфора тесно связан с обменом кальция, поэтому для диагностики различных патологических состояний важное значение имеет установление количественного соотношения между содержанием кальция и неорганического фосфора в крови. В норме концентрация кальция и фосфора в крови относится как 2 : 1.

*Принцип*

Фосфорная кислота безбелкового фильтрата сыворотки крови реагирует с ванадатом и молибдатом аммония с образованием фосфорнованадиево-молибденовой кислоты желтого цвета. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации неорганического фосфора в пробе и определяется фотометрически.

*Материал исследования:* сыворотка крови

*Реактивы*

Набор реактивов фирмы "Лакхема"

*Проведение анализа*

	<b>ОПЫТ, мл</b>	<b>СТАНДАРТ, мл</b>
Сыворотка	0,2	–
Эталонный раствор	–	0,2
Дистилл. вода	1,0	1,0
Трихлоруксусная кислота	1,0	1,0
	Перемешивают и через 5 мин фильтруют через смоченный водой фильтр	
Фильтрат	1,0	1,0
Рабочий реактив	1,0	1,0
	Перемешивают и через 20 мин измеряют оптическую плотность растворов данных пробирок при 400 нм	

*Расчет*

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

где  $E_{оп}$  – оптическая плотность пробы,  $E_{ст}$  – оптическая плотность стандарта,  $C_{ст}$  – концентрация стандартного раствора, 1,5 ммоль/л

*Нормальные величины*

Сыворотка крови

дети	Новорожденные	1,13-2,78 ммоль/л
------	---------------	-------------------

	до 1 года	1,45-2,10 ммоль/л
--	-----------	-------------------

	после 1 года	1,45-1,78 ммоль/л
--	--------------	-------------------

взрослые		0,81-1,45 ммоль/л
----------	--	-------------------

Моча		25,8-48,4 ммоль/сут
------	--	---------------------

*Практическое значение*

Уровень фосфора зависит от функции паращитовидных желез, содержания соматотропина и вазопрессина, регулирующего действия витамина  $D_3$ , от функции почек.

Гиперфосфатемия встречается при почечной недостаточности, при гиперпаратиреозе, гипервитаминозе  $D$ , при приеме тироксина, при ультрафиолетовом облучении, диабете, кетозе.

Гипофосфатемия характерна для ранней стадии рахита, при гиперпаратиреозе, остеомаляции, пеллагре, длительном лечении инсулином и хлоридом кальция, микседеме.

*Оформление работы*

В протокол опыта следует внести принцип метода, результаты опыта, нормальные величины и практическое значение. Сделать вывод по полученным результатам.

### Лабораторная работа 3

#### **Колориметрический метод определения хлоридов в крови**

*Принцип*

Хлорид-ионы освобождают из хлораниловокислой ртути (II) хлораниловую кислоту в количестве, пропорциональном содержанию хлорид-ионов в пробе, и определяется фотометрически.

*Материал исследования:* сыворотка крови

*Реактивы*

1) Стандартный раствор  $NaCl$ , 100 ммоль/л, 2) Раствор хлораниловокислой ртути, 3) Эфир.

*Проведение анализа*

	<b>ОПЫТ, мл</b>	<b>КОНТРОЛЬ, мл</b>
Сыворотка	0,02	–
Раствор NaCl	–	0,02
Хлораниловокислая ртуть	2,0	2,0
	В течение 1 мин энергично встряхивают, оставляют стоять 10 мин.	
Эфир	2 капли	2 капли
	Фильтруют через смоченный водой фильтр и измеряют оптическую плотность фильтрата сыворотки и эталона при 530 нм.	

*Расчет*

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

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

*Нормальные величины*

Плазма 94-110 ммоль/л

Эритроциты 45-54 ммоль/л

*Клинико-диагностическое значение*

Гиперхлоремия наблюдается при обезвоживании, вызванном недостаточным поступлением жидкости, при повышенном поступлении хлорида натрия, декомпенсации сердца, при метаболическом ацидозе и респираторном алкалозе, снижении экскреции хлорид-ионов с мочой при нефритах, отравлении салицилатами, приеме глюкокортикоидов.

Гипохлоремия встречается чаще и возникает при недостаточном поступлении хлоридов и избыточной потере их через желудочно-кишечный тракт при заболеваниях, сопровождающихся неукротимой рвотой и поносом, при длительном потоотделении, при стенозе привратника, почечном диабете, сахарном диабете, при сморщенной почке. Концентрация хлорид-ионов может снижаться в результате их перераспределения и задержке в поврежденных тканях при хронических воспалительных процессах, абцессах, некрозах.

*Оформление работы*

Записывают принцип метода. Оформляют результаты и делают вывод о возможных патологиях.

## СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ ПО РАЗДЕЛУ «БИОХИМИЯ КРОВИ»

1. Больной очень истощен вследствие тяжелого заболевания желудочно-кишечного тракта, нарушения процессов переваривания и всасывания. Какие изменения содержания белка сыворотки крови и его фракций можно ожидать при обследовании?
2. У больного появились отеки. Концентрация какого вида белка крови изменилась? Каковы взаимоотношения водного обмена и состояния белков плазмы?
3. Ребенок перенес инфекционное заболевание. Какие изменения белковых фракций крови можно ожидать?
4. Человека укусил клещ. Какой лечебный белковый препарат ему необходимо ввести? Почему?
5. У больного обнаружены в плазме крови «патологические белки», не существующие в норме. Как называется это состояние? О каком заболевании говорит появление миеломных белков?
6. При обследовании у пациента в сыворотке крови обнаружен С-реактивный белок. Можно ли считать его здоровым человеком?
7. При исследовании крови больного в плазме обнаружено 0,6 ммоль/л мочевой кислоты. Сколько мочевой кислоты содержится в крови здоровых людей? Могут ли данные этого анализа быть надежным критерием для распознавания заболевания? Какой диагноз заболевания? Каковы биохимические нарушения, типичные для данного заболевания?
8. У больного тяжелая форма сахарного диабета. Можно ли предполагать нарушение кислотно-основного равновесия? Какой вид?
9. У альпиниста при тяжелом подъеме на большую высоту учащенное глубокое дыхание. Может ли у него нарушиться кислотно-основное равновесие? Как?

## РАЗДЕЛ 14. БИОХИМИЯ ПОЧЕК

### ТЕМА 14.1. ИССЛЕДОВАНИЕ НОРМАЛЬНОЙ И ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ МОЧИ

#### *Актуальность*

Почки участвуют в регуляции водно-солевого баланса, поддержании кислотно-основного состояния, осмотического давления жидкостей организма, кровяного давления, стимуляции эритропоэза. Почка образует и выделяет мочу, продуцируемую из компонентов плазмы. Объем и состав мочи может меняться в значительных пределах, отражая состояние, прежде всего водно-электролитного обмена и других сторон метаболизма организма. Физико-химические свойства и состав мочи изменяются при ряде заболеваний почек и других органов и систем организма, то есть при тех процессах, при которых изменяется кислотно-основное состояние, осмотическое давление жидкости в организме, происходит потеря белка и других компонентов крови, выделение ряда веществ, отсутствующих в моче здорового человека. Такие явления наблюдаются при остром и хроническом гломерулонефрите, нефрозе, болезнях печени и крови, подагре, онкологических заболеваниях. При патологии может изменяться количество мочи, ее прозрачность, цвет, запах, рН и плотность. Поэтому обследование каждого больного, не только в стационаре, но и в амбулаторных условиях должно сопровождаться обязательным анализом мочи, так как это исследование может помочь в постановке диагноза, а нередко совершенно изменить первоначальные диагностические предположения.

#### *Цель*

Освоение методов определения основных показателей мочи (относительной плотности, рН) и патологических компонентов.

#### *Вопросы для самоподготовки:*

1. Назовите особенности строения нефрона.
2. Назовите главные процессы образования мочи: фильтрация в клубочках, реабсорбция и секреция в канальцах. Укажите понятие клиренса.
3. Охарактеризуйте основные регуляторные механизмы, лежащие в основе образования мочи: ренин-ангиотензиноген-ангиотензиновая система, вазопрессин (антидиуретический гормон), альдостерон, паратгормон, кальцитонин.



4. Охарактеризуйте роль почек в поддержании кислотно-основного состояния (КОС): ацидогенез, аммионогенез, экскреция кислот.
5. Назовите особенности метаболизма почечной ткани, ферменты, использующиеся для диагностики заболеваний почек: глицинамидинотрансфераза, изоферменты лактатдегидрогеназы (ЛДГ-1 и ЛДГ-2), и аланинаминопептидазы (ААП-3).
6. Охарактеризуйте общие свойства мочи здорового человека: количество, цвет, прозрачность, запах, относительная плотность, рН.
7. Назовите химический состав мочи здорового человека: содержащие и не содержащие азот органические компоненты, неорганические компоненты.
8. Укажите изменение функции нефрона и канальцев почек при патологии.
9. Назовите нарушения основных регуляторных механизмов, лежащих в основе формирования мочи.
10. Назовите количество выделяемой мочи в норме и при патологии (анурия, полиурия, олигурия), ее цвет, плотность при патологических состояниях, а также патогенез этих состояний.
11. Назовите причины аммиачного и гнилостного запаха, а также запаха ацетона мочи.
12. Назовите причины изменения рН мочи при патологии.
13. Назовите причины изменения прозрачности мочи.
14. Укажите изменения химического состава мочи при патологии.
15. Назовите причины изменения активности ферментов в моче при патологии.

### Лабораторная работа 1

#### **Определение относительной плотности мочи**

Определение относительной плотности жидкостей производят с помощью ареометров, для исследования мочи используют специальную разновидность ареометров – урометры. Урометры бывают двух типов: для мочи с нормальной относительной плотностью (от 1,000 до 1,030) и для мочи с высокими показателями (от 1,030 до 1,060). Шкала урометра калибруется при 15°C.

#### *Оборудование*

Урометр, высокий цилиндр для мочи, термометр.

*Материал исследования:* моча

*Проведение анализа*

В высокий узкий цилиндр наливают по стенке мочу и осторожно погружают в нее урометр. Необходимо следить, чтобы урометр не касался стенок и дна цилиндра. Производят отсчет по шкале урометра, используя нижний мениск жидкости. При наличии пены ее удаляют фильтровальной бумагой. В случае большой относительной плотности мочи берут второй тип урометра (шкала 1,030-1,060). Если моча имеет температуру, не соответствующую условиям, отмеченным на урометре, или 15°C, то на каждые 3°C выше или ниже этой температуры соответственно добавляют или отнимают по 0,001 от показаний шкалы урометра.

*Нормальные величины*

Моча 1,010-1,025, чаще 1,017-1,020

*Практическое значение*

Относительная плотность мочи прямо зависит от концентрации растворимых веществ и находится в обратной связи с количеством выделяемой мочи. Несоответствие между относительной плотностью и количеством мочи отмечается при сахарном диабете, когда относительная плотность вследствие глюкозурии остается высокой, несмотря на большое количество мочи.

## Лабораторная работа 2

### Определение pH мочи

*Материал исследования:* свежая моча

*Проведение анализа*

Полоску универсальной индикаторной бумаги опускают в пробирку с мочой и по изменению цвета, сравнивая с эталонной шкалой на упаковке, устанавливают pH исследуемой мочи.

*Нормальные величины*

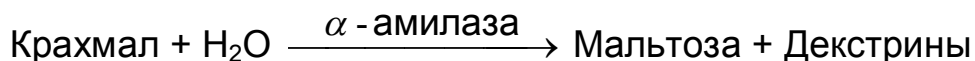
Моча 5,0-7,0

*Практическое значение*

Преобладание в пище животных белков определяет сдвиг в кислую сторону, преобладание растительной пищи – в основную. Резко кислая реакция отмечается при лихорадочных состояниях, диабете, голодании, недостаточности почек и другой патологии. Щелочная реакция мочи наблюдается при цистите, пиелитах, гематурии, после рвоты, диареи (поноса), при рассасывании экссудатов, после приема соды и щелочных минеральных вод.

**Лабораторная работа 3**  
**Колориметрический метод определения**  
**активности амилазы мочи**

$\alpha$ -Амилаза (диастаза, 1,4- $\alpha$ -D-глюкангидролаза, КФ 3.2.1.1.) катализирует гидролиз  $\alpha$ -1,4-глюкозидных связей крахмала и гликогена до мальтозы и декстринов.



*Принцип*

$\alpha$ -Амилаза катализирует гидролиз нерастворимого цветного крахмального субстрата с образованием синего, растворимого в воде красителя. Количество освобожденного красителя пропорционально каталитической активности фермента.

*Реактивы*

1) Фосфатный буфер, рН=7,0, 2) крахмальный субстрат, 3) 9 ммоль/л раствор NaCl, 4) осаждающий раствор: 1,85 ммоль/л MgSO<sub>4</sub>, сульфосалициловая кислота (2 ммоль/л).

*Материал исследования:* свежая моча

*Проведение анализа*

	<b>ОПЫТ 1, мл</b>	<b>ОПЫТ 2, мл</b>
Суспензия субстрата	1,0	1,0
	Инкубируют при 37°C в течение 5 мин	
Моча	–	0,05
	Инкубируют точно 15 мин при 37°C.	
Осаждающий раствор	2,0	2,0
	Перемешивают и через 15 мин центрифугируют в течение 5 мин при 3000 об/мин (или фильтруют через вату). Измеряют оптическую плотность надосадочной жидкости против воды при длине волны 590 нм (зеленый светофильтр).	

*Расчет*

Активность фермента в моче находят по приложенной калибровочной таблице, исходя из полученной оптической плотности. Найденную по таблице каталитическую активность необходимо умножить на 2.

Оптическая плотность	Активность фермента (Е/л)	Оптическая плотность	Активность фермента (Е/л)
0,046.....	40	0,402.....	400
0,068.....	60	0,449.....	450
0,089.....	80	0,495.....	500
0,110.....	100	0,501.....	550
0,120.....	110	0,587.....	600
0,130.....	120	0,679.....	700
0,150.....	140	0,769.....	800
0,170.....	160	0,859.....	900
0,190.....	180	0,948.....	1000
0,210.....	200	1,037.....	1100
0,229.....	220	1,125.....	1200
0,259.....	250	1,212.....	1300
0,288.....	280	1,473.....	1600
0,307.....	300	1,645.....	1800
0,354.....	350	1,816.....	2000

Если проба имеет высокую активность, ее разбавляют физиологическим раствором, определение проводят снова, а результат умножают на разведение.

*Нормальные величины*

Моча 1000-2000 Е/л

*Практическое значение*

Повышение активности фермента происходит главным образом при воспалении и дегенеративных изменениях поджелудочной железы, особенно при остром панкреатите, остром некрозе pancreas, сахарном диабете. В детском возрасте повышение наблюдается при эпидемическом паротите, что указывает на поражение поджелудочной железы вирусом паротита, иногда поражает поджелудочную железу и вирус гриппа.

Лабораторная работа 4

**Полуколичественное определение глюкозы**

Индикаторная бумага "Гликофан" представляет собой полоски бумаги 0,5×7,5 см, имеющие поперечную зону светло-желтого цвета, пропитанную раствором ферментов и красителя.

*Принцип*

Метод основан на специфическом окислении глюкозы с помощью фермента глюкозооксидазы. Образовавшаяся при этом перекись водорода разлагается пероксидазой и окисляет

добавленный краситель. Изменение окраски красителя свидетельствует о присутствии глюкозы в моче.

*Материал исследования:* свежая моча

*Реактивы*

Индикаторная бумага "Гликофан"

*Проведение анализа*

Тест-полоску погружают в мочу так, чтобы индикаторная зона полностью смочилась. Немедленно извлекают полоску и через 2 минуты сравнивают цвет индикаторной зоны с цветной шкалой, имеющейся в комплекте. Содержание глюкозы соответствует наиболее совпадающему со шкалой цвету полоски.

*Нормальные величины*

Моча 0,06-0,83 ммоль/л или < 2,78 ммоль/сут

*Практическое значение*

Уровень глюкозы возрастает при всех случаях гипергликемии свыше 10 ммоль/л (почечного порога). Глюкозурии могут быть физиологическими и патологическими. К первым относятся алиментарная глюкозурия, глюкозурия беременных и нейрогенная глюкозурия на почве стрессовых состояний. Патологическая глюкозурия обнаруживается при сахарном диабете, тиреотоксикозе, акромегалии, гиперплазии коры надпочечников, инфаркте миокарда, кровоизлияниях во внутренние органы, отравлениях морфином, фосфором, при острых инфекциях и нервных заболеваниях. При нормогликемии глюкозурия может выявляться при повреждениях почечных канальцев – пиело- и гломерулонефриты, токсические поражения, почечный диабет (семейная почечная глюкозурия), нефропатии.

Снижение глюкозы в моче (вплоть до исчезновения) является признаком бактериурии.

*Оформление работы*

Записывают принцип методов, результаты исследования, практическое значение и делают вывод по возможной патологии.

### Лабораторная работа 5

#### **Определение содержания кетоновых тел, восстанавливающих веществ, глюкозы, белка, pH с помощью тест-полосок "Пентафан"**

Диагностические полоски "Пентафан" имеют пять зон индикации, наклеенных на полимерную подложку. Реакции зон основаны на следующих принципах:

КЕТОНЫ (белый с кремовым оттенком квадратик) – зона содержит щелочной нитропруссид, дающий с ацетоуксусной кислотой и ацетоном розовое или даже темно-фиолетовое окрашивание.

ВОССТАНАВЛИВАЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА (светло-желтый квадратик) – зона содержит кислотный буфер в смеси с фосфорно-молибденовой кислотой, которая под действием сильных восстановителей (главным образом, аскорбиновой и гентизиновой кислот) превращается в молибденовый синий.

ГЛЮКОЗА (ярко-желтый квадратик) – зона содержит ферменты глюкозооксидазу и пероксидазу, а также хромогенную систему, которая в присутствии глюкозы окисляется с образованием зеленых или даже синих продуктов.

БЕЛОК (светлый серо-зеленый квадратик) – зона содержит кислотный буфер в смеси со специальным индикатором, изменяющим в присутствии белков окраску от желтой через зеленую до синей.

рН (оранжево-красный квадратик) – зона содержит смешанный кислотно-основной индикатор с переходом красной окраски через желтую и зеленую в синюю в интервале рН 5-9.

#### *Материал исследования*

Нормальная моча (без ацетона, глюкозы и белка), патологическая моча (с ацетоном, глюкозой и белком).

#### *Реактивы*

Диагностические полоски "Пентафан"

#### *Проведение анализа*

Полоску погружают в исследуемую мочу и немедленно вынимают. Через 30-60 секунд окраску зон индикации сравнивают с соответствующей цветной шкалой. Величину рН отсчитывают непосредственно после погружения полоски.

#### *Оформление работы*

Записывают принцип методов, результаты исследования, практическое значение и делают вывод по возможной патологии.

### Лабораторная работа 6

#### **Экспресс-метод определения глюкозы**

Диагностические полоски "Глюкофан" имеют 2 зоны индикации: 1 – верхняя, ярко-желтая зона – для выявления и определения глюкозы в моче, 2 – нижняя светло-желтая зона – вспомогательная, указывающая на наличие сильно восстанавливающих веществ,

которые конкурентным действием снижают реактивность зоны на глюкозу.

#### *Принцип*

Метод основан на ферментной глюкозооксидазной реакции. Ярко-желтая зона пропитана растворами ферментов глюкозооксидазы, пероксидазы и красителями. Глюкоза с помощью глюкозооксидазы окисляется кислородом воздуха до глюконовой кислоты с образованием перекиси водорода. Перекись водорода в присутствии фермента пероксидазы окисляет краситель, и наступает изменение желтой окраски в зеленую.

Индикация наличия сильно восстанавливающих веществ (в основном аскорбиновой кислоты и гомогентизиновой) основана на восстановлении фосфорно-молибденовой кислоты в молибденовую синь.

*Материал исследования:* свежая моча, содержащая глюкозу

#### *Реактивы*

1) Диагностические полоски "Глюкофан"

#### *Проведение анализа*

Полоску погружают в исследуемую мочу и немедленно вынимают. Через 20-30 секунд оценивают зону индикации для восстанавливающих веществ:

а) если она окрашена слабее, чем квадратик "1" на соответствующей цветной шкале сравнения, находящейся на этикетке упаковки, или же одинаково с ним, то в пределах 30-60 секунд делают оценку пробы на глюкозу, сравнив зону индикации для глюкозы с соответствующей цветной шкалой.

б) если зона индикации для восстанавливающих веществ окрашена сильнее, пробу на глюкозу оценивают через 1-2 минуты после погружения полоски.

в) при содержании восстанавливающих веществ свыше "2" уже нельзя дать надежную оценку пробы на глюкозу, поэтому исследование необходимо повторить не раньше, чем через 10 часов после последнего приема аскорбиновой кислоты.

Концентрацию глюкозы определяют по соответствию окраски зоны индикации с цветными квадратиками на шкале:

Обозначения на шкале	г/л	ммоль/л
1	0,5	2,78
2	1,0	5,55
3	3,0	16,7
4	15,0	83,3

#### *Оформление работы*

Записывают принцип методов, результаты исследования, практическое значение и делают вывод по возможной патологии.

### Лабораторная работа 7

#### **Определение концентрации кетоновых тел**

##### *Материал исследования*

Нормальная моча (без ацетона), патологическая моча (с ацетоном).

#### *ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЕТОНОВЫХ ТЕЛ И ГЛЮКОЗЫ В МОЧЕ С ПОМОЩЬЮ ТЕСТ-ПОЛОСОК "DIAPHAN"*

##### *Принцип*

Определение кетоновых тел основано на реакции Легаля. Проба более чувствительна к ацетоуксусной кислоте, чем к ацетону, с  $\beta$ -гидроксимасляной кислотой не реагирует. Определение глюкозы основано на глюкозооксидазной реакции.

##### *Проведение анализа*

Не прикасаясь руками к зоне индикации, из пенала упаковки берут 2 полоски: одну опускают на 1-2 секунды в сосуд с патологической мочой, другую – с нормальной мочой. Капли мочи удаляют, проведя полоской по краю сосуда. Полоски оставляют в горизонтальном положении. Через 60 секунд сопоставляют окраску зон индикации с соответствующей цветной шкалой для кетоновых тел и глюкозы.

#### *ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЕТОНОВЫХ ТЕЛ В МОЧЕ И СЫВОРОТКЕ КРОВИ С ПОМОЩЬЮ ТЕСТ-ПОЛОСОК "КЕТОФАН"*

##### *Принцип*

Желтая полоска (зона индикации) на полосках содержит щелочной буфер в смеси с нитропруссидом натрия, дающий с ацетоном и ацетоуксусной кислотой фиолетовое окрашивание. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации кетоновых тел в исследуемой жидкости.



**Проведение анализа**

Не прикасаясь руками к зоне индикации, из пенала упаковки берут полоску и погружают на 1-2 секунды в исследуемую жидкость (патологическая моча или сыворотка) и через 1 минуту сравнивают со шкалой на этикетке упаковки. Концентрацию кетоновых тел определяют по таблице:

Порядковый номер по шкале	1	2	3	4
Концентрация кетоновых тел, ммоль/л	1-2	2-4,9	4,9-14,7	14,7

**Нормальные величины**

Сыворотка 0,1-0,6 ммоль/л

Моча отсутствие

**Практическое значение**

Содержание кетоновых тел в крови – кетонемия – увеличивается (в 100-1000 раз) при голодании, сахарном диабете, при повышении концентрации жиромобилизующих гормонов. Кетонемия обычно сопровождается появлением кетоновых тел в моче – кетонурия. Патологическое состояние организма, вызванное токсическим действием кетоновых тел носит название кетоз, переходящий в кетоацидоз.

**Оформление работы**

Записывают принцип методов, заносят в таблицу результаты исследования, практическое значение и делают вывод по возможной патологии.

	Название метода	Материал исследования		Выявляемое вещество	Результаты реакции
1	Проба Легаля	Моча	Нормальная	Кетоновые тела	
			Патологическая		
2	Проба Либена	Моча	Нормальная		
			Патологическая		
3	Тест "Diaphan"	Моча	Нормальная		
			Патологическая		
4	Тест "Кетофан"	Моча	Нормальная		
			Патологическая		
		Сыворотка			

## Лабораторная работа 8

### Определение гемоглобина и эритроцитов с помощью тест-полосок "Гемофан"

В моче могут находиться компоненты крови либо в виде кровяных клеток эритроцитов (гематурия, эритроцитурия) либо в виде гемоглобина (гемоглобинурия).

#### *Принцип*

Зона индикации тест-полосок содержит органическую гидроперекись, кислый буфер и хромоген, который в присутствии гемоглобина окисляется гидроперекисью с образованием окрашенных в синий цвет продуктов.

*Материал исследования:* свежая моча с кровью

#### *Реактивы*

Диагностические полоски "Гемофан".

#### *Проведение анализа*

Полоску погружают в пробу мочи и немедленно вынимают. Через 1 минуту сравнивают окраску зоны индикации с цветной шкалой.

Обозначение на шкале сравнения	Гемоглобин, мг/л	Эритроциты, $10^6$ /л
1	0,15-0,45	5-15
2	0,45-1,50	15-50
3	1,50-2,40	50-80
4	более 3,00	более 100

Окраску полосок, возникшую через 3 минуты, не принимают во внимание. При отрицательной реакции зона индикации остается желтоватой (без зеленого оттенка). В присутствии свободного гемоглобина зона индикации окрашивается в зеленый (синий) цвет. Интактные эритроциты образуют на светлом фоне яркие зелено-синие точки, и даже пятнышки.

#### *Нормальные величины*

У взрослых и больших детей выделяется незначительное количество эритроцитов, которые не могут быть обнаружены обычными химическими способами. У маленьких детей число эритроцитов в моче более значительно и может быть установлено.

#### *Оформление работы*

Записывают принцип методов, результаты исследования, практическое значение и делают вывод по возможной патологии.

## СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ ПО РАЗДЕЛУ «БИОХИМИЯ ПОЧЕК»

1. Моча пациента А имеет соломенно-желтый цвет, Б – ярко-желтый; В – цвет пива; Г – цвет «мясных помоев». Какие вещества оказывают влияние на цвет мочи?
2. Согласно рекомендации врача пациент ограничил употребление мяса, рыбы и значительно увеличил содержание в пище овощей и фруктов. а) Как изменится рН мочи? б) Изменится ли содержание в моче мочевины?
3. В моче ребенка и взрослого мужчины обнаружен креатинин и креатин. Является ли это отклонением от нормы?
4. В моче пациента отмечено существенное увеличение концентрации креатинина. Какие причины креатининурии?
5. У больного ребенка в моче методом хроматографии обнаружена фенилпировиноградная кислота, а в крови фенилаланин (0,4 г/л). Встречается ли фенилпировиноградная кислота в моче здоровых людей?
6. У больного с мочой за сутки выделяется 1,5 г мочевой кислоты (норма до 0,7г), повышено ее содержание и в крови. Врач рекомендовал лечебный препарат аллопуринол, а также диету с ограничением мясной пищи. Какую болезнь Вы диагностируете? Принцип действия аллопуринола?

## РАЗДЕЛ 15. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ

### ТЕМА 15.1. БИОТРАНСФОРМАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

#### *Актуальность*

Чужеродные химические вещества (ксенобиотики) могут активно вмешиваться в течение нормальных процессов организма, извращать их и индуцировать развитие патологических процессов, протекающих по различным механизмам, обусловленным структурой и концентрацией того или иного токсиканта. Различные чужеродные вещества попадают в организм через ЖКТ или с вдыхаемым воздухом и могут в зависимости от их физико-химических свойств на определенный срок аккумулироваться в различных органах. Лекарственные препараты, обладающие фармакологическим действием, способствуют нормализации физиологических функций организма. Вместе с тем они являются чужеродными для организма веществами, в ряде случаев с выраженным токсическим эффектом. Попав в организм, ксенобиотики взаимодействуют с ферментными системами дезинтоксикации и подвергаются тем или иным метаболическим превращениям, или биотрансформации. Разделяют две фазы биотрансформации. В результате реакции первой фазы (окисление, восстановление или гидролиз) в молекулу ксенобиотика вводятся полярные группы, а вторая фаза (конъюгация) связана с ассоциацией чужеродного вещества с эндогенными гидрофильными молекулами. Выведение чужеродных веществ и их метаболитов из организма происходит в основном с желчью или с мочой.

#### *Цель*

Знакомство с некоторыми методами определения продуктов биотрансформации лекарственных веществ.

#### *Вопросы для самоподготовки:*

1. Какие вещества называются ксенобиотиками?
2. Назовите пути поступления ксенобиотиков в организм человека.
3. Назовите биохимические аспекты повышения биодоступности лекарственных препаратов.
4. Назовите преимущества липосом, укажите другие формы, как носители лекарств.
5. Назовите этапы превращения лекарственных веществ (фармакокинетика) при энтеральном введении.

6. Охарактеризуйте превращение лекарств в ЖКТ. Укажите влияние pH среды, ферментов и др. факторов.
7. Охарактеризуйте транспорт лекарственных веществ в крови, связывание с белками крови.
8. Охарактеризуйте распределение и фиксацию лекарственных веществ в органах и тканях.
9. Назовите виды транспорта веществ через мембраны клеток.
10. Назовите механизмы обезвреживания ксенобиотиков в органах и тканях, фазы биотрансформации, их значение.
11. Охарактеризуйте механизмы клеточной рецепции и прямого действия лекарственных веществ (фармакодинамика).
12. Какой процесс называют микросомальным окислением? Назовите микросомальные оксидазы, их взаимосвязь с внемитохондриальными цепями переноса электронов.
13. Напишите строение и схему функционирования цитохрома P<sub>450</sub>.
14. Укажите схему транспорта электронов при монооксигеназном окислении с участием цитохрома P<sub>450</sub>.
15. Назовите возможные модификации ксенобиотиков в первой фазе обезвреживания.
16. Приведите примеры модификации основного эффекта лекарств.
17. Приведите примеры реакций конъюгации. Укажите их биологическое значение.
18. Охарактеризуйте экскрецию лекарственных веществ и продуктов их биотрансформации.
19. Назовите индивидуальную вариабельность биотрансформации лекарств. Укажите примеры.

### Лабораторная работа 1

#### **Определение ПАСК в моче экспресс-методом с применением бумаги «Биофанпас»**

ПАСК (парааминосалициловая кислота) противотуберкулезный препарат. По туберкулостатической активности ПАСК уступает изониазиду и стрептомицину и назначается, поэтому в сочетании с другими, более активными, противотуберкулезными препаратами (изониазидом, циклосерином, канамицином, стрептомицином и др.)

Назначают внутрь в виде порошка, таблеток. При приеме внутрь ПАСК хорошо всасывается и проникает в сыворотку крови и ткани внутренних органов. Биотрансформация ПАСК осуществляется в печени, причем 50% препарата выделяется с мочой в конъюгированном виде, и 50% в свободном. Поэтому в

процессе лечения необходимо систематически исследовать мочу и кровь, таким образом, проверяя функциональное состояние печени. При нарушении процессов превращения препарата в печени, увеличивается количество, выделяемой с мочой парааминосалициловой кислоты.

Для контроля роста применяются индикаторные полоски «Биофанпас», которые пропитаны индикаторным реактивом.

#### *Принцип*

В основу положена реакция нитрования бензольного кольца, протекающая в кислой среде в присутствии  $\text{NaNO}_2$ , в результате которой появляется желтое окрашивание.

#### *Проведение анализа*

Полоску смочить исследуемой жидкостью (моча) и через 30 секунд сравнить окраску с цветной шкалой. Интенсивность окраски не должна превышать окраски зоны «позитивно». В случае более яркого желтого тона с переходом в оранжевый цвет, необходимо уменьшить дозу ПАСК.

### Лабораторная работа 2

#### **Методы исследования биотрансформации ксенобиотиков**

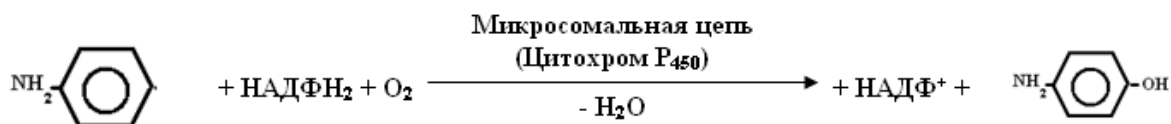
В исследовании биотрансформации ксенобиотиков возможны два подхода. Во-первых, определение состава и содержания продуктов биотрансформации ксенобиотика в биологических жидкостях и экскретах. Во-вторых, определение активности ферментов, участвующих в превращении ксенобиотика, и изучение кинетики действия данных ферментов на различные соединения.

В экспериментах применяют оба подхода. В клинике метаболизм лекарственного средства оценивают, как правило, по содержанию в биологических жидкостях изучаемого вещества и его продуктов обмена.

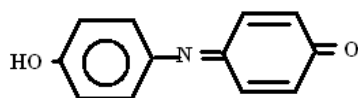
#### *ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГИДРОКСИЛАЗНОЙ АКТИВНОСТИ МИКРОСОМ ПЕЧЕНИ (Е.А. СТРОЕВ И СОАВТ., 1989)*

#### *Принцип*

Метод основан на определении содержания 4-аминофенола, образующегося при гидроксилировании анилина в монооксигеназной цепи микросом с участием цитохрома  $\text{P}_{450}$ .



4-аминофенол при взаимодействии с фенолом и в присутствии карбоната натрия образует окрашенный индофенольный комплекс синего цвета:



### Реактивы

1) 1,15 % раствор хлорида калия; 2) 0,08 М раствор Трис-НСI буфер, рН 7,4; 3) 0,03 М раствор перекиси водорода; 4) 0,16 М раствор хлорида магния; 5) 10% раствор карбоната натрия; 6) 2 % раствор фенола в 0,2 М растворе гидроксида натрия; 7 ) 0,03 М раствор НАДФН; 8) 4-аминофенол, свежеприготовленный раствор для построения калибровочного графика (5,45 мг/л).

### Материал исследования

Печень животного после забоя.

### Принцип исследования

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.

### Проведение анализа

1.Выделение микросомальной фракции из печени крыс. После забоя животного печень омывают от крови раствором хлорида калия (1,15% раствор) из шприца, обсушивают ее фильтровальной бумагой и помещают в чашку Петри, стоящую на льду.

Затем 3 г ткани печени измельчают ножницами и переносят в стакан гомогенизатора, куда предварительно наливают 9 мл охлажденного раствора хлорида калия. Стакан помещают в лед и гомогенизируют с тефлоновым пестиком при 1000 об/мин в течение 40 сек.

Гомогенат разливают в две центрифужные гильзы и центрифугируют на ЦЛР при 10 000 г в течение 20 мин при 0-4°C. Надосадочную жидкость сливают в другие центрифужные гильзы, прибавляют раствор КСI в соотношении 1: 5 по объему.

Перемешивают и вновь центрифугируют при 3000 g в течение 15 мин при 0-4°C.

Надосадочную жидкость сливают. К осадку, содержащему обогащенную фракцию микросом, добавляют 3 мл раствора трис-буфера (0,1 М раствор с рН 7,4) и с помощью пипетки, втягивая и выдувая жидкость, получают взвесь микросом.

2. Исследование гидроксилирования анилина. Для изучения гидроксилирования анилина берут две чистые пробирки и готовят контрольную и опытную пробы. Последовательность внесения компонентов и их объем приведены в таблице.

Опытная проба			Контрольная проба		
№	Компоненты	Объем (мл)	№	Компоненты	Объем (мл)
1	Трис-НСI-буфер	0,4	1	Трис-НСI-буфер	0,4
2	Хлорид магния	0,4	2	Хлорид магния	0,4
3	НАДФН	0,2	3	Взвесь микросом	0,1
4	Взвесь микросом	0,1	4	ТХУ	0,5
5	Анилин	0,11	5	НАДФН	0,11
			6	Анилин	0,2

Обе пробирки помещают на 20 мин в водяную баню при 37 С. В опытной пробе реакцию останавливают, приливая 0,5 мл ТХУ. Далее обе пробы центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин.

Из каждой пробы отбирают по 1 мл надосадочной жидкости и переносят в две другие пробирки. Затем приливают к ним по 0,5 мл карбоната натрия и по 1,5 мл раствора фенола. Перемешивают содержимое встряхиванием.

Для развития окраски пробирки помещают на 30 мин в водяную баню при 37°C.

Затем измеряют экстинцию опытной пробы против контрольной на ФЭКе или СФ при 630 нм.

Содержание 4-аминофенола в пробах определяют по калибровочному графику.

Расчет проводят по формуле

$$X = (A \times V) / 20 ,$$

где X - гидроксилазная активность, нмоль/мин; A - содержание 4-аминофенола в пробе, найденное по калибровочному графику; V - объем пробы, равный 1,71 мл; 20 - время инкубации, мин.



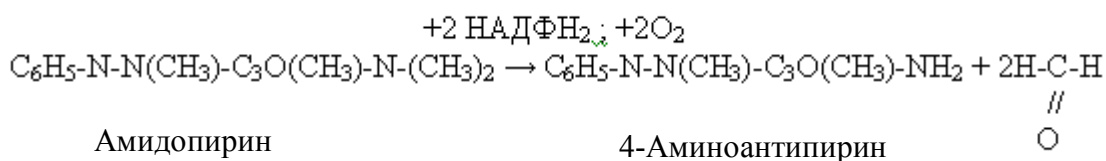
### Практическое значение

Биотрансформация ксенобиотиков осуществляется с участием ферментов, содержащихся в тканях и жидкостях организма. Их состав определяет специфичность превращения любого чужеродного соединения. Метаболизм ксенобиотиков зависит от пути поступления их в организм. В пищеварительном тракте возможен гидролитический распад чужеродных веществ, в биологических жидкостях они подвергаются и некоторым другим превращениям (оксидоредукции, конъюгации), а в клетках происходят самые разнообразные реакции их биотрансформации.

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. Скорость реакции гидроксилирования изменяется при действии многих внешних факторов (радиации, гипероксии, гипоксии, интоксикации четыреххлористым углеродом и т.д.), под влиянием ряда регуляторов (витаминов, гормонов).

#### ОБНАРУЖЕНИЕ ПРОДУКТОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ АМИДОПИРИНА (Е.А. СТРОЕВ И СОАВТ., 1986)

Биотрансформация амидопирин осуществляется с помощью ферментативных реакций окисления и конъюгации. Первая из них (N-деметилирование) катализируется монооксигеназной ферментной системой эндоплазматического ретикулума клеток печени по схеме:



Далее 4-аминоантипирин с участием соответствующей N-ацетилтрансферазы и ацетил-КоА подвергается ацетилированию с образованием N-ацетил-4-аминоантипирин:



вода). Полученная экстинция ( $E_2$ ) соответствует содержанию в моче 4-аминоантипирипа.

4. К профильтрованному гидролизату второй пробы приливают 0,6 аммиачного буфера. Смесь перемешивают и вновь фильтруют.

5. К 0,8 мл прозрачного фильтрата второй пробы добавляют последовательно 0,2 мл дистиллированной воды, 2 мл раствора фенола и 0,1 мл раствора гексацианоферрата (III) калия. Содержимое перемешивают и через 10 минут (но не позже чем через час) фотометрируют на КФК при 510 нм в кювете с толщиной слоя 1 см против контроля (контролем может служить дистиллированная вода). Полученная экстинция ( $E_2$ ) соответствует содержанию в моче суммы метаболитов (4-аминоантипирин и N-ацетил-4-аминоантипирин).

6. Содержание продуктов биотрансформации амидопирин в моче рассчитывают по калибровочному графику.

По  $E_1$  находят общее количество в мкг/мл выделенного 4-аминоантипирина, умножая содержание его в первой пробе на суточный объем мочи (в мл) ( $C_1$ ).

По  $E_2$  определяют аналогичным образом сумму метаболитов амидопирин (4-аминоантипирин и N-ацетил-4-аминоантипирин), выделенных за сутки с мочой ( $C_2$ ).

Количество ацетилированного метаболита (N-ацетил-4-аминоантипирина), выделенного с мочой за сутки находят по разности  $C_2 - C_1$ .

Ацетилирующую активность ферментных систем организма X (в %) находят по формуле:

$$X = (E_2 - E_1) \times 100\% / E_1$$

где  $E_1$  и  $E_2$  - соответствующие экстинции опытных проб.

#### *Практическое значение работы*

Изучение состава и соотношения метаболитов разных лекарственных веществ, поступающих в организм, позволяет косвенно оценивать активность ферментных систем печени, участвующих в биотрансформации ксенобиотиков.

## ЭТАЛОНЫ ОТВЕТОВ К ТЕСТОВЫМ ВОПРОСАМ И СИТУАЦИОННЫМ ЗАДАЧАМ

### *ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ по разделу «Строение, свойства и функции белков»:*

1. – 2) цистин
2. – 2) увеличивается содержание NH<sub>2</sub>-групп
3. – 3) гистидин, 4) лизин, 5) аргинин
4. – 1) фенилаланин, 3) триптофан, 4) тирозин
5. – 2) тирозин, 3) треонин, 5) серин
6. – 2) метионин, 4) цистеин, 6) цистин
7. – 2) аспарагиновая, 4) глутаминовая
8. – 2) лизин, 4) аргинин, 6) гистидин
9. – 3) нейтральный
10. – 2) транспорт кислорода
11. – 2) фибриллярный белок волос
12. – 3) альбумин, 4) гемоглобин, 5) глобулин
13. – 1) адреналин мозгового слоя надпочечников, 2) тироксин щитовидной железы
14. – 1) альбумина
15. – 2) гистона
16. – 2) коллоидные растворы
17. – 3) гистидина
18. – 3) серина

### *Ситуационные задачи по разделу «Строение, классификация и роль витаминов»:*

1. Для авитаминоза А специфично поражение глазного яблока ксерофтальмия, т.е. развитие сухости роговой оболочки глаза как следствие закупорки слёзного канала в связи с ороговением эпителия. Глазное яблоко не омывается слезой, которая, как известно, обладает бактерицидным свойством. Вследствие этого развиваются воспаления конъюнктивы, отёк, изъязвление и размягчение роговой оболочки.
2. Следует предполагать, что варфарин препятствует действию витамина К. Биологическая функция витамина К связана с его участием в процессе свёртывания крови, активации факторов: протромбина, проконвертина, фактора Кристмаса; фактора Стюарта. Поэтому, основным проявлением авитаминоза К

является сильное кровотечение, часто приводящее к шоку и гибели организма.

3. Жирорастворимые витамины всасываются и усваиваются организмом при участии липидов. Поэтому нарушение переваривания липидов может явиться причиной развития авитаминозов витаминов жирорастворимой группы.
4. Подкожные кровоизлияния, кровь в кале, носовые кровотечения являются характерными признаками авитаминоза витамина К, биологическая роль которого связана с участием в процессе свёртывания крови. В медицинской практике при кровоточивости или кровотечениях, связанных с понижением свертывания крови используют препараты витамина К, и его синтетический аналог - викасол.
5. Назначение чрезмерных доз витаминов, а также избыточный прием, фруктов, богатых данным жирорастворимым витамином (например, печени белого медведя, или кита, богатых данным жирорастворимым витамином А) служит причиной гипервитаминозов. Способность жирорастворимых витаминов депонироваться в тканях обусловлена их физическими свойствами и сопровождается клиническими и биохимическими признаками нарушений.
6. При приеме избыточных количеств витамина Д развивается витаминная интоксикация. Она проявляется деминерализацией костей и их переломами. Уровень кальция и фосфатов в крови резко повышается (они извлекаются из костей, всасываются из кишечника и реабсорбируются в почках). Это приводит к кальцификации внутренних органов – сосудов, легких, почек и др. Суточная потребность в витамине Д – 0,012-0,025 мг.
7. Действие витамина К на процессы свёртывания крови происходит в печени, поэтому внесенный в пробирку с кровью витамин К действия не оказывает.
8. При закупорке желчного протока нарушается процесс поступления желчи из печени в кишечник. Желчные кислоты не могут участвовать в переваривании жиров, эмульгировать их и делать доступными для действия липазы. Поэтому, больному следует назначать витаминные препараты, содержащие жирорастворимые витамины.
9. Наиболее ранний и характерный признак недостаточности витамина А – нарушение сумеречного зрения. Участие витамина А в фотохимическом акте зрения, связывают с вхождением его

активной формы (11-цис-ретиаль) в качестве кофермента в состав зрительного пигмента палочек сетчатки глаза – родопсина. Палочки реагируют на слабое освещение (сумеречное, ночное зрение). Под действием квантов света родопсин диссоциирует с выделением транс-ретиала и опсина. В темноте (ночное видение) обусловлено регенерацией родопсина из опсина и 11-цис-ретиала. Отсутствие регенерации родопсина приводит к слепоте в сумерках.

10. При заболеваниях печени и желчного пузыря нарушается процесс поступления желчи из печени в кишечник. Желчные кислоты не могут участвовать в переваривании жиров, как следствие нарушается процесс всасывания липидов и вместе с тем всасывание жирорастворимых витаминов.
11. Фолиевая кислота образует коферменты, участвующие в реакциях переноса одноуглеродных радикалов при синтезе пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, таким образом, играя исключительную роль в биосинтезе нуклеиновых кислот и процессах деления клеток. Если в питательной среде содержатся аденин и тимин, то бактерии могут использовать их для синтеза нуклеотидов нуклеиновых кислот и при отсутствии фолиевой кислоты.
12. Гиповитаминоз антианемического витамина  $B_{12}$  обычно сочетается с понижением кислотности желудочного сока, что может быть результатом повреждения слизистой оболочки желудка. Обкладочными клетками желудка синтезируется фактор Касла, в соединении с которым, осуществляется всасывание витамина.
13. В составе сырого яичного белка содержится белок – авидин, который обладает способностью связывать биотин с образованием нерастворимого в воде комплекса. Этот комплекс не переваривается в желудочно-кишечном тракте, и, таким образом, биотин, хотя и содержится в пищевых продуктах, не подвергается всасыванию.
14. Источником пищевого ниацина (витамина PP) являются мясные, особенно печень, и многие растительные продукты. Однако в отличие от других витаминов ниацин может синтезироваться в тканях организма из триптофана.
15. Кишечная микрофлора в достаточной степени синтезирует некоторые витамины (например, фолиевую кислоту и др.). Однако использование сульфаниламидных препаратов для

лечения ряда заболеваний может подавлять этот синтез, вызывая развитие авитаминозов. Являясь структурными аналогами парааминобензойной кислоты, эти препараты ингибируют синтез фолиевой кислоты у микроорганизмов. Именно поэтому при лечении антибиотиками и сульфаниламидными препаратами необходимо назначать поливитамины.

16. Обкладочными клетками желудка синтезируется фактор Касла, в соединении с которым, осуществляется всасывание витамина В<sub>12</sub>. Нарушение процесса всасывания ведет к развитию гипо- и авитаминоза, в результате развивается анемия. Следует рекомендовать лекарственные препараты витамина В<sub>12</sub>.
17. Витамин РР может синтезироваться в тканях организма из триптофана. Из 60 молекул триптофана образуется одна молекула никотиамида.
18. Развитие эпилептиформных припадков, является характерным признаком пиридоксиновой недостаточности (витамина В<sub>6</sub>). Повышенная возбудимость центральной нервной системы и периодические судороги, связаны с недостаточным образованием гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), являющейся тормозным медиатором нейронов мозга.
19. В печени витамин Д<sub>3</sub> гидроксилируется в положении 25 и 1, образуя биологически активное соединение 1, 25 – дигидроксихолекальциферол (кальцитриол). Кальцитриол выполняет гормональную функцию, участвуя в регуляции обмена кальция и фосфатов, стимулируя всасывание кальция в кишечнике, кальцификацию костной ткани, реабсорбцию кальция в почках. Развивающаяся остеопороз, является результатом нарушения процесса кальцификации костной ткани, вследствие недостаточной выработки кальцитриола при хроническом заболевании печени.

#### *ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ по разделу «Ферменты»*

1. – 4) белками
2. – 3) уреазы
3. – 1) 1,5-2,5
4. – 3) 7,5-8
5. – 5) 10-11
6. – 3) близком к нейтральному, при рН 7
7. – 2) 80-100°С

8. – 3) 35-40°C
9. – 1) трансфераз, 4) лиаз
10. – 1) метильных
11. – 2) пиридоксальных
12. – 3) обратимого превращения дисульфидных групп в сульфгидрильные
13. – 3) CO<sub>2</sub>
14. – 3) никотинамидадениндинуклеотид
15. – 2) пантотеновая кислота
16. – 3) пиридоксальфосфат
17. – 3) НАД
18. – 4) перенос фосфатной группы от донорной молекулы к акцепторной
19. – 3) органоспецифичность
20. – 1) очистки ран и участков омертвевшей ткани, 3) заместительной терапии при нарушении переваривания, в случае их недостаточности
21. – 3) ослаблении антигенных свойств ферментов

*ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ по разделу  
«Нуклеиновые кислоты»*

1. – 1) пуриновые основания, 3) пентозы, 4) фосфорная кислота
2. – 2) аденин, 4) цитозин, 5) урацил
3. – 2) гуанин, 3) аденин, 4) тимин, 5) цитозин
4. – 4) β-D-дезоксирибофураноза
5. – 1) аденозин, 2) дезокситимидин, 5) цитидин
6. – 2) уридин-5'-фосфорная кислота, 3) дезоксицитидин-5'-фосфорная кислота, 5) адениловая кислота
7. – 2) ГТФ, 3) ЦТФ, 4) АТФ
8. – 1) дГДФ
9. – 4) гетероциклических соединений
10. – 3) гуанином
11. – 2) 3',5'-фосфодиэфирные
12. – 2) А–Т, 3) А–У, 4) Г–Ц
13. – 4) хроматина в ядре
14. – 2) уменьшение вязкости, 3) гиперхромный эффект

*ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ по разделу  
«Виды переноса генетической информации»*

1. – 1) "адаптора" аминокислот к кодонам мРНК



2. – 2) матрицы для синтеза белка
3. – 1) дАТФ, 3) дГТФ, 4) ТТФ
4. – 1) транскриптон, 2) оперон
5. – 1) рифамицин
6. – 2) аминокислоты, 3) aa-тРНК-синтетазы
7. – 2) стрептомицин, 3) тетрациклины, 4) эритромицины
8. – 1) ДНК-полимераза  $\delta$  (дельта)
9. – 2) олигорибонуклеотидом (около 8-10  
рибонуклеотидов), 3) фрагментом комплементарным  
цепи мРНК
10. – 2) ДНК-топоизомеразы

*ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ по разделу  
«ИммуноБиохимия»*

1. – 1) в В-лимфоцитах
2. – 2) гликопротеинами
3. – 2) с антигенами
4. – 2) G, 3) D, 4) E
5. – 1) функцией, 2) молекулярной массой, 3) первичной  
структурой тяжелых цепей
6. – 2) взаимодействия переменных областей тяжелой и  
легкой цепей
7. – 2) типом тяжелой цепи
8. – 4) G
- 9) – 3) A

*ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ по разделу  
«Биологические мембраны»*

1. – 3) митохондриальная
2. – 2) пропускать только определенные вещества
3. – 3) простой диффузии
4. – 3) пиноцитоза
5. – 1) пассивный симпорт

*ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ по разделу  
«Введение в обмен веществ и энергии»*

1. – 2) в матриксе митохондрий
2. – 3) в генерации водорода (образование ЗНАДН и  
1ФАДН<sub>2</sub>)

3. – 2)  $\alpha$ -кетоглутарата в сукцинил-КоА, 3) малата в оксалоацетат, 4) сукцината в фумарат, 6) изоцитрата в  $\alpha$ -кетоглутарат
4. – 2) четыре
5. – 2) 2,4-динитрофенол
6. – 2) сукцинат, 3) малат, 5) изоцитрат, 6)  $\alpha$ -кетоглутарат
7. – 4) 12 АТФ
8. – 2) величинами окислительно-восстановительных потенциалов компонентов ЦПЭ

*ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ по разделу  
«Обмен функции углеводов»:*

1. – 3) тонком кишечнике
2. – 2) амилазы, 4) мальтазы, 5) сахаразы
3. – 2) лактат
4. – 1) глюконеогенез, 5) распад гликогена
5. – 2) лактат, 3) глицерин, 4) аминокислоты
6. – 1) распад гликогена, 3) глюконеогенез
7. – 1) синтез гликогена, 2) поступление глюкозы в клетки, 5) энергетическое использование глюкозы (гликолиз и др.)
8. – 3) гликолиз, 4) гликогенолиз
9. – 3) гликогенфосфорилаза
10. – 1) снижение потребления глюкозы и прекращение накопления лактата
11. – 3) гликогенсинтаза
12. – 2) в генерации НАДФН, 3) в снабжении пентозами для синтеза нуклеиновых кислот

*Ситуационные задачи по разделу  
«Обмен и функции углеводов»:*

1. Глюкозурия наблюдается при увеличении содержания глюкозы в крови выше «почечного порога» (9,5-10 ммоль/л). После одновременного приема 200 г сахара уровень глюкозы может превысить этот порог, и тогда в моче появится глюкоза. Употребление большого количества сахара не件лезно.
2. После употребления хлеба в пищу быстрого и значительного повышения глюкозы в крови не наблюдается, т.к. расщепление крахмала, содержащегося в хлебе, в желудочно-кишечном тракте происходит медленно, образовавшаяся глюкоза поступает в кровь постепенно в небольших концентрациях.

3. Нет, уровень сахара в крови может повыситься и как следствие стресс - реакции, для которой характерно увеличение уровня адреналина в крови и тканях.
4. При окислении глюкозы образуется ацетил-КоА. Дальнейшее его использование, если клетка нуждается в энергии, заключается в вовлечении в ЦТК, где происходит генерирование водородов для синтеза АТФ в дыхательной цепи; если физическая нагрузка недостаточна, то ацетил-КоА используется для синтеза высших жирных кислот, далее вовлекаемых в синтез триацилглицеролов. Следовательно, при потреблении избыточного количества сладостей и ограниченной физической нагрузке потребляемые углеводы будут метаболизироваться в жиры, депонирующиеся в жировых депо, в результате может развиваться ожирение.
5. При выполнении физической нагрузки в тканях развивается кислородная задолженность, работа в определенной степени выполняется за счет активации анаэробных процессов (гликолиза), в результате в тканях и крови накапливается молочная кислота.
6. При беге на дистанцию 5000м лучше, чем на 100-метровой, ткани обеспечиваются кислородом за счет увеличения скорости объема кровотока. Кислородная задолженность организма меньше, поэтому активированы аэробные процессы обмена, уровень молочной кислоты в крови и тканях ниже, чем у спортсмена, пробежавшего 100 м.
7. Существенного снижения уровня глюкозы в крови при кратковременном голодании не происходит, т.к. активируется синтез глюкозы из аминокислот. Стабильность уровня глюкозы в крови – важный параметр гомеостаза, т.к. гипогликемия нарушает функцию мозга, для которого глюкоза является основным источником энергии.
8. Причинами гипергликемии могут быть: 1) прием углеводов с пищей (алиментарная гипергликемия); 2) распад и мобилизация гликогена вследствие увеличения содержания адреналина (эмоциональная гипергликемия), усиление выработки глюкагона и других факторов, стимулирующих активность фосфоорилазы печени; 3) нарушение утилизации глюкозы тканями при инсулярной недостаточности; 4) увеличение синтеза глюкозы (глюконеогенез), стимулируемое стероидными гормонами. Для уточнения причин гипергликемии нужно узнать у пациента время приема пищи перед обследованием, исключить возможность

введения стероидных гормонов. Провести тест толерантности к глюкозе («сахарную кривую»), определить содержание в моче глюкозы, кетоновых тел, небелкового азота.

9. Глюкозурия при нормальном уровне глюкозы в крови свидетельствует о нарушении реабсорбции ее в почечных канальцах («почечный диабет»).
10. Инсулин, введенный парентерально (подкожно) снизит содержание глюкозы в крови, т.к. будет способствовать ее проникновению в клетку, фосфорилированию и утилизации в тканях, а также синтезу гликогена.
11. Повышение содержания галактозы в крови и моче при соответствующих симптомах позволяет думать о наследственной болезни галактоземии. В основе ее лежит нарушение активности ферментов, превращающих галактозу, входящую в состав молочного сахара, в глюкозу. Это приводит к нарушению функции мозга, хрусталика, в энергетическом метаболизме которых глюкоза играет решающую роль. Из рациона должно быть исключено молоко.
12. Переваривание лактозы, содержащейся в молоке, осуществляется кишечным ферментом лактазой. Угнетение его активности приводит к нарушению усвоения молока (непереносимость молока).
13. Гипогликемия, являющаяся причиной судорог, отсутствие повышения уровня глюкозы при введении адреналина позволяют предполагать отсутствие или очень низкую активность фермента глюкозо-6-фосфатазы печени. Нарушение активности этого фермента характерно для I типа гликогеноза – болезни Гирке.

*ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ по разделу  
«Обмен и функции липидов»:*

1. – 2) льняного масла, 3) подсолнечного масла
2. – 1) кефалины, 2) лецитин, 3) фосфотидилсерин
3. – 1) желчные кислоты, 2) гормоны надпочечников,  
4) половые гормоны
4. – 5) витамин Д
5. – 3) полиненасыщенной жирной кислоты
6. – 1) фосфолипазы, 4) липаз
7. – 1) нарушение синтеза панкреатической липазы,  
3) нарушение поступления желчи в кишечник,

4) затруднение поступления панкреатического сока в кишечник.

8. – 1) желчные кислоты

9. – 2) карнитин

10. – 3) 9 молекул

11. – 1) окислительное декарбоксилирование пирувата,  
2)  $\beta$ -окисление ЖК

12. – 2) НАДФН

13. – 2) жирных кислот, 3) стероидов, 4) кетоновых тел

14. – 3) печень

15. – 1) липолиз в жировой ткани, 2)  $\beta$ -окисление в печени,  
3) синтез кетоновых тел в печени

16. – 4) ЛПВП

*Ситуационные задачи по разделу  
«Обмен и функции липидов»:*

1. Качество и вкус масла зависят от содержания в нем свободных жирных кислот, особенно, таких как масляная, валериановая, пропионовая и др., имеющих неприятный запах и вкус. Содержание их возрастает при гидролизе жира, интенсивность которого зависит от качества хранения. Количество жирных кислот определяется т.н. «кислотным числом», величина которого для каждого сорта установлена государственным стандартом. Так, например, кислотное число для животных жиров высшего сорта не должно превышать 1,2, первого сорта - 2,2 мг КОН /г жира.
2. У грудного ребёнка, который питается только молоком, важное значение имеет наличие в желудочном соке высокоактивной липазы, расщепляющей жиры молока. Она активна при рН 5,0, у взрослого человека рН желудочного сока 1,5-2,0 липаза не активна.
3. При задержке попадания желчи в двенадцатиперстную кишку нарушается активация панкреатической липазы, ухудшается переваривание жиров, всасывание жирных кислот и жирорастворимых витаминов, ухудшается моторная функция кишечника, развивается гиперхолестеринемия.
4. Основную роль в переваривании жиров в тонком кишечнике играет липаза, она синтезируется в поджелудочной железе и активируется желчными кислотами, которые также эмульгируют жиры и способствуют их всасыванию кишечной стенкой в виде

мицелл. Следовательно, причиной стеатореи может быть: 1) недостаток соляной кислоты желудочного сока, которая активирует синтез секретина, стимулирующего функцию поджелудочной железы; 2) нарушение синтеза ферментов в поджелудочной железе; 3) нарушение синтеза и выведения в кишечник желчных кислот; 4) нарушение всасывания на уровне кишечного эпителия.

5. Через 1-2 часа после приема пищи в крови повышается содержание триацилглицеринов, и появляются ХМ. Максимум алиментарной липемии приходится на 4-6 часов после приема пищи.
6. При недостаточности активности липопротеинлипазы наблюдается хиломикронемия (увеличение содержания в крови хиломикронов), повышается содержание триацилглицеринов. Заболевание относится к гиперлиппротеинемии типа I. Часто имеет наследственный характер.
7. В яде змей содержится высокоактивная фосфолипаза  $A_2$ , под влиянием которой происходит гидролитическое отщепление жирной кислоты в положении 2-глицерофосфолипида. Образующиеся лизофосфатидазы токсичны, разрушают мембрану эритроцитов, вызывая гемолиз.
8. Спортсмен перед стартом находится в состоянии стресса, характеризующегося активацией симпато-адреналовой системы. Увеличение уровня адреналина активирует через аденилатциклазную систему фосфолипазу, стимулирующую распад гликогена, увеличение глюкозы в крови и активность гормончувствительной липазы жировой ткани. Этот фермент расщепляет триацилглицерины на глицерин и жирные кислоты. Связанные с альбумином плазмы они транспортируются в мышцы, где окисляются с образованием АТФ.
9. У здорового человека содержание кетоновых тел в крови очень мало (0,2 ммоль/л), с мочой в сутки выделяется до 10 мг. Увеличение содержания кетоновых тел в моче (кетонурия) возникает при повышении их концентрации в крови (кетонемии). Причинами кетонемии являются: углеводное голодание тканей, усиление окисления липидов, недостаточное поступление ацетил-КоА, тяжелые физические нагрузки.
10. Да. При диабетической коме у больного легко обнаружить запах ацетона выдыхаемого воздуха. Такой же запах имеет моча.

11. Жировая дистрофия печени связана с нарушением синтеза фосфолипидов, которые являются важными компонентами липопротеинов, транспортирующих эндогенные липиды из печени. Синтез фосфолипидов может лимитироваться дефицитом холина или доноров метильных групп (метионин и др.), называемых липотропными веществами. Угнетение синтеза фосфолипидов приводит к нарушению транспорта жиров из печени. Для профилактики и лечения рекомендуется ограничение жиров животного происхождения, творог, белок которого казеин содержит много метионина.
12. При ожирении необходимо сокращать употребление углеводов, так как: 1) продукты окисления углеводов активно участвуют в синтезе жиров, поэтому избыточное потребление их способствует накоплению жира в организме; 2) ограничение углеводов в пищевом рационе способствует усилению расходования (окисления) жиров для обеспечения энерготрат.
13. При атеросклерозе врача интересует содержание холестерина, а также ЛПОНП и ЛПНП.
14. Диета, показанная больным атеросклерозом, имеет низкую калорийность в ней уменьшено содержание углеводов и жиров животного происхождения, много витаминов и клетчатки.
15. Повышение ЛПОНП при нормальном содержании ЛПНП расценивается как гипер- $\beta$ -липопротеинемия – тип IV. Она характерна для диабета, ожирения, ИБС.

*ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ по разделу  
«Обмен белков»*

1. – 3) пепсина
2. – 2) трипсин
3. – 1) карбоксипептидаза
4. – 2) окислительный
5. – 3) глутамат
6. – 1) тироксина, 3) адреналина, 4) норадреналина
7. – 3) серотонин
8. – 2) глутамата
9. – 2) глутамат, 4) аспарат
10. – 3) лизин, 5) валин
11. – 3) триптофан
12. – 2) мочевины
13. – 2) распада пуриновых нуклеотидов

*Ситуационные задачи по разделу  
«Обмен белков»*

1. Низкая кислотность желудочного сока, снижение активности пепсина способствуют развитию микрофлоры, процессов гниения, которые сопровождаются образованием сероводорода. Для нормализации переваривания можно рекомендовать соляную кислоту с пепсином или желудочный сок.
2. Индикан – калиевая соль индоксилсерной кислоты, синтезирующаяся в печени при обезвреживании токсичного индола в реакции с ФАФС (фосфоаденозилфосфосульфат). Выводится из организма с мочой. Увеличение индикана в моче, свидетельствует об усилении гнилостных процессов в кишечнике.
3. Аминотрансферазы – внутриклеточные ферменты. В миокарде особенно активны АсАТ и АлАТ, а в печени – АлАТ. При повреждении клеточных мембран их активность в крови возрастает. При заболевании сердца (инфаркт миокарда) особенно в ранние сроки в крови очень активна АсАТ.
4. Проявление аллергии (зуд, краснота, отек) в значительной степени связаны с увеличением концентрации гистамина в тканях. Поэтому у больных целесообразно исследовать содержание гистамина и активность фермента гистаминазы, катализирующей его превращение из аминокислоты гистидин.
5. Наследственно обусловленный недостаток фенилаланингидроксилазы блокирует метаболические превращения фенилаланина в тирозин. В тканях, крови, моче возрастает содержание фенилаланина и его кето- и оксипродуктов. У ребенка резко замедляется умственное развитие, поэтому болезнь называется фенилпировиноградная олигофрения или фенилкетонурия. В питании должен быть ограничен фенилаланин.
6. Основным процессом биоэнергетики клетки является ЦТК (цикл трикарбоновых кислот). При взаимодействии  $\alpha$ -кетоглутарата с аммиаком синтезируется глутамат, который связывая аммиак, образует нетоксичный глутамин. Эти реакции являются первичными, если не единственными путями детоксикации аммиака в мозге. Интенсивное их осуществление может нарушить течение ЦТК и энергообеспечение клеток мозга. Снижение уровня АТФ ведет к нарушению функции клеток мозга.



*ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ по разделу  
«Гормональная регуляция обмена веществ»*

1. – 4) эстрон, 5) тестостерон
2. – 1) адреналин, 2) норадреналин, 4) трийодтиронин
3. – 2) простагландинов
4. – 2) глюкагон, 3) инсулин
5. – 3) альдостерон
6. – 1) паратгормон, 2) кальцитонин
7. – 4) вазопрессин
8. – 1) адреналин, 2) глюкагон
9. – 1) в паращитовидной железе, 2) в поджелудочной железе, 3) в щитовидной железе
10. – 4) болезнь Аддисона
11. – 3) в семенниках, 5) в коре надпочечников
12. – 3) тиреотропин
13. – 2) глюкагон, 4) адреналин
14. – 4) инсулин
15. – 1) адренокортикотропин
16. – 1) адреналин
17. – 3) инсулин
18. – 1) глюкокортикоиды

*Ситуационные задачи по разделу  
«Гормональная регуляция обмена веществ»*

1. Полиурия, низкая плотность мочи, отсутствие глюкозурии и гипергликемии позволяют предполагать несахарный диабет. Его причиной является дефицит вазопрессина (антидиуретического гормона).
2. Повышение возбудимости и раздражительности, а также общего обмена, температуры тела по вечерам, гипер-гликемия и гиперазотурия являются признаками гиперфункции щитовидной железы, увеличения выработки гормонов щитовидной железы (базедова болезнь).
3. Значительное замедление физического и умственного развития, снижение интенсивности процессов обмена характерно для гипофункции щитовидной железы. Болезнь носит название «кретинизм».
4. При инсулярной недостаточности нарушается усвоение глюкозы тканями, утилизация ацетил-КоА, образующегося при окислении жирных кислот, клетки испытывают энергетический голод, по

этой причине у больной возникает чувство голода, и он потребляет большое количество пищи. Из-за усиления глюконеогенеза и развития гипергликемии жидкость из тканей выходит в кровь, появляется чувство жажды, количество мочи увеличивается (полиурия).

5. Избыточное потребление углеводов вызывает гиперфункцию инсулярного аппарата с последующим его истощением. Избыток углеводов под влиянием инсулина идет на синтез липидов, способствуя развитию ожирения, особенно выраженного у больных пожилого возраста. Частота заболевания СД нарастает пропорционально избыточности веса.
6. Выраженная гипогликемия, отсутствие кетонемии и кетонурии, а также глюкозурии позволяют думать о гипо-гликемической коме. Необходимо внутривенно ввести глюкозу.

*Ситуационные задачи по разделу  
«Биохимия крови»*

1. Недостаток питания, т. е. поступления в организм необходимых аминокислот и других веществ, нарушает синтез белка. При анализе крови будет отмечена гипопроотеинемия, снижение содержания альбуминов.
2. Альбумины – гидрофильны, они активно удерживают воду в составе гидратной оболочки, поэтому снижение их уровня понижает онкотическое давление, способствует выходу воды в межклеточное пространство, развивается отек.
3. Успешная борьба с инфекцией определяется реактивностью иммунной ткани, выработкой антител, большая часть которых находится во фракции гамма-глобулинов. Поэтому благоприятное течение инфекционной болезни характеризуется увеличением содержания гамма-глобулинов.
4. При укусе клеща возможно попадание вируса и заражение весеннее-летним энцефалитом. Заболевание не развивается, если в организме человека высоко содержание соответствующих антител, находящихся во фракции гамма-глобулинов. Поэтому для профилактики заболевания после укуса клеща вводится гамма-глобулин из крови лошадей, иммунизированных вирусом клещевого энцефалита.
5. Появление в плазме крови «патологических белков» называют «парапротеинемией», с этим состоянием часто связано увеличение общего содержания белков до 100-160 г/л. Так, у

больных миеломной болезнью появляются в сыворотке крови специфические «миеломные белки». Они могут преодолевать почечный барьер и появляются в моче. Их называют белковые тела «Бенс-Джонса».

6. С-реактивный называется белок, вступающий в реакцию преципитации с С-полисахаридом пневмококка. У здорового человека его в крови нет.
7. В крови здоровых людей содержится 0,18-0,24 ммоль/л мочевой кислоты. Резкое увеличение концентрации мочевой кислоты в крови наблюдается при подагре. Установление этого факта может быть надежным критерием для распознавания заболевания. Избыточное образование мочевой кислоты – как конечного продукта пуринового обмена – или задержка её выведения с мочой может привести к её накоплению в крови, отложению в виде нерастворимых солей в связочном аппарате, суставах или в мочевыводящих путях (мочекаменная болезнь).
8. Для сахарного диабета характерно увеличение содержания в тканях кетоновых тел (кетонемия). При этом патологическом состоянии щелочной резерв снижается, моча становится более кислой, развивается метаболический ацидоз.
9. В результате глубокого и чистого дыхания из организма выводится большое количество углекислоты, уменьшается щелочной резерв, развивается респираторный алкалоз.

*Ситуационные задачи по разделу  
«Биохимия почек»*

1. Моча А – цвет обычный; Б – ярко-желтый цвет обусловлен присутствием значительного количества витамина В<sub>2</sub>, принятого в поливитаминном комплексе; В – «цвет пива» обычно имеет моча, содержащая билирубин, необходимо провести специальный анализ; Г – «цвет мясных помоев» имеет моча, содержащая значительное количество крови.
2. При употреблении преимущественно мясной пищи моча имеет более кислую реакцию, поэтому переход на вегетарианскую пищу смещает реакцию среды в щелочную сторону. В связи с уменьшением содержания в пище белка, и следовательно, выделения аммиака, уменьшается образование мочевины, меньше ее будет выводиться с мочой.
3. В моче ребенка в норме содержится и креатинин, и креатин, тогда как у взрослого – только креатинин.

4. Содержание креатинина в моче возрастает при заболевании мышечной, эндокринной системы, печени, а у здоровых людей, только после тяжелой физической нагрузки.
5. Фенилпировиноградная кислота – продукт нарушения обмена фенилаланина. Врожденный дефект обмена – отсутствие в организме специфического фермента - фенилаланингидроксилазы, извращает обмен фенилаланина. В норме обмен этой аминокислоты идет через гидроксилирование с образованием тирозина, при фенилкетонурии фенилаланин превращается в фенилпировиноградную кислоту, которая в больших количествах выводится с мочой. Фенилкетонурия и высокое содержание фенилаланина в крови типичны для врожденного слабоумия.
6. Нарушение пуринового обмена, характеризующееся резким увеличением содержания мочевой кислоты в крови, моче, отложением её в суставах, носит название подагра. Лечебный эффект аллопуринола – структурного аналога гипоксантина основан на ингибировании ксантиноксидазы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

### *ОСНОВНАЯ ЛИТЕРАТУРА*

1. Биохимия: Учебник / Под ред. чл.-корр.РАН.проф.Е.С.Северина. – 5-е изд. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 768 с.: ил.
2. Биохимия: Краткий курс с упражнениями и задачами / Под ред. Е.С.Северина, А.Я.Николаева. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2005. – 448 с.
3. Василенко Ю.К. Биохимические основы фармации. Метаболизм лекарств. учебное пособие, Пятигорск, ПятГФА, 2001. – 83 с.
4. Комов В.П. Биохимия: учебник для ВУЗов / В.П.Комов, В.Н.Шведова. – М.: Дрофа, 2004. – 640 с.
5. Щербак И.Г. Биологическая химия : учебник. – СПб. : Изд-во СПбГМУ, 2005. – 480 с.

### *ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА*

1. Биохимия: Учебник / Под ред. Е.С.Северина. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2003. – 784 с.
2. Трудные вопросы биохимии. Избранные лекции по общей и частной биохимии: учебное пособие / Под ред. Т.С.Федоровой, В.Ю.Сереброва. Часть1. – Томск: СибГМУ, 2006. – 318 с.
3. Канская Н.В., Жаворонок Т.В., Рязанцева Н.В., Цыров Г.И., Бодрова Т.Н., Тетенев Ф.Ф, Серебров В.Ю., Черногорюк Г.Э., Байков А.Н., Позднякова И.А. Интерпретация результатов основных лабораторных методов исследования в в клинической практике. Учебно-методическое пособие. - Томск: СибГМУ, Ацтек, 2006. – 154 с.
4. Биохимия: Краткий курс с упражнениями и задачами / Под ред. чл.-корр.РАН.проф.Е.С.Северина, проф.А.Я.Николаева. – 2-е изд., испр. И доп. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2002. – 448 с.: ил. – (Серия "XXI век").

ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ ПО  
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ  
для студентов фармацевтического факультета

*Учебное пособие для студентов фармацевтического факультета*

ПОЗДНЯКОВА Ирина Анатольевна  
ИВАНОВ Владимир Владимирович  
КАНСКАЯ Наталья Викторовна  
ТИМИН Олег Алексеевич  
КОЛЕСОВА Нина Ивановна

под редакцией В.Ю.Сереброва, Т.С.Федоровой

Подписано в печать \_\_\_\_\_  
Формат \_\_\_\_\_. Бумага \_\_\_\_\_  
Печать \_\_\_\_\_. Гарнитура \_\_\_\_\_. Печ.лист \_\_\_\_  
Тираж \_\_\_\_\_ экз. Заказ N \_\_\_\_

Отпечатано в \_\_\_\_\_  
Заказ N \_\_\_\_