

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

И.А. Позднякова, В.В. Иванов, Н.В. Канская,
О.А. Тимин, О.Е. Акбашева

Лабораторный практикум по биологической химии

Учебно-практическое издание
для студентов фармацевтического факультета

2-е издание, переработанное и дополненное

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

Томск
Издательство СибГМУ
2016

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

Рецензент:

Кадырова Т.В. – доцент кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, кандидат фармацевтических наук.

Авторы:

И.А. Позднякова, В.В. Иванов, Н.В. Канская, О.А. Тимин, О.Е. Акбашева

Л 125 Лабораторный практикум по биологической химии: учебно-практическое пособие / И. А. Позднякова, В. В. Иванов, Н. В. Канская и др. ; под ред. В. Ю. Сереброва, Т. С. Федоровой. – 2-е изд., перераб. и доп. – Томск: Изд-во СибГМУ, 2016. – 197 с.

ISBN 978-5-98591-117-6

Материал учебно-практического пособия подготовлен по дисциплине «Биологическая химия» в соответствии с Федеральным государственным стандартом высшего профессионального образования для студентов, обучающихся по основным профессиональным образовательным программам высшего образования – программам специалитета по специальности «Фармация».

В пособии, в соответствии с темами, приведены рекомендуемые лабораторные работы, применяемые в медицине для диагностики заболеваний и в фармации при стандартизации и контроле качества лекарств, а также методы определения продуктов биотрансформации при исследовании метаболизма ксенобиотиков. Изложены вопросы практического применения иммунохимических методов анализа и ДНК-технологий в фармации и медицине. Описаны преимущества и указаны перспективные направления использования иммобилизованных ферментов.

УДК 577.1:615.01(075.8)
ББК Е072Я7 + Р282Я7

Утверждено и рекомендовано к печати Центральным методическим советом ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (протокол № 1 от 3 марта 2016 г.).

ISBN 978-5-98591-117-6

© Издательство СибГМУ, 2016
© И.А. Позднякова, В.В. Иванов, Н.В. Канская,
О.А. Тимин, О.Е. Акбашева, 2016

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	5
Список сокращений	6
Раздел 1. СТРОЕНИЕ, СВОЙСТВА И ФУНКЦИИ БЕЛКОВ	7
Тема 1.1. Строение и классификация аминокислот	7
Тема 1.2. Строение и физико-химические свойства белков	9
Практическое применение денатурирующих агентов в медицине	12
Тема 1.3. Классификация и функции белков в организме	13
Раздел 2. СТРОЕНИЕ, КЛАССИФИКАЦИЯ И РОЛЬ ВИТАМИНОВ	19
Тема 2.1. Жирорастворимые витамины	19
Практическое применение жирорастворимых витами- нов	22
Тема 2.2. Водорастворимые витамины	23
Практическое применение водорастворимых витами- нов в медицине	26
Раздел 3. ФЕРМЕНТЫ	31
Тема 3.1. Строение и свойства ферментов	31
Тема 3.2. Классификация ферментов	34
Применение ферментов в медицине и фармации	43
Раздел 4. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ	51
Тема 4.1. Строение и свойства нуклеиновых кислот	51
Раздел 5. ВИДЫ ПЕРЕНОСА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ	58
Тема 5.1. Матричные биосинтезы нуклеиновых кислот	58
Тема 5.2. Регуляция и матричный биосинтез белка	59
Практическое применение ДНК-технологий в фарма- ции и медицине	63
Раздел 6. ИММУНОБИОХИМИЯ	68
Тема 6.1. Биохимические основы иммунитета	68
Практическое применение иммунохимических мето- дов анализа в медицине и фармации	71
Раздел 7. БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ	76
Тема 7.1. Строение и функции биологических мембран	76
Раздел 8. ВВЕДЕНИЕ В ОБМЕН ВЕЩЕСТВ И ЭНЕРГИИ	80
Тема 8.1. Биологическое окисление	80
Раздел 9. ОБМЕН И ФУНКЦИИ УГЛЕВОДОВ	84
Тема 9.1. Строение и внешний обмен углеводов	84

Тема 9.2. Анаэробные пути превращения углеводов в клетках ...	86
Тема 9.3. Аэробные пути превращения углеводов	91
Раздел 10. ОБМЕН И ФУНКЦИИ ЛИПИДОВ	99
Тема 10.1. Строение и внешний обмен липидов	99
Тема 10.2. Внутриклеточный метаболизм триацилглицеринов	102
Тема 10.3. Внутриклеточный обмен сложных липидов	105
Раздел 11. ОБМЕН БЕЛКОВ	113
Тема 11.1. Внешний обмен простых белков	113
Тема 11.2. Основные пути внутриклеточного метаболизма ами- но кислот	119
Тема 11.3. Обезвреживание аммиака в организме	122
Тема 11.4. Обмен сложных белков – нуклеопротеинов	126
Тема 11.5. Обмен сложных белков – гемопротеинов	129
Практическое значение определения билирубина в сыворотке и моче	134
Раздел 12. ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ	139
Тема 12.1. Биохимия гормонов белково-пептидной природы и производных аминокислот	139
Тема 12.2. Биохимия гормонов стероидной природы	142
Практическое применение гормонов	145
Раздел 13. БИОХИМИЯ КРОВИ	151
Тема 13.1. Азотсодержащие вещества крови: белки, ферменты, фракции остаточного азота	151
Практическое значение методов фракционирования белков	153
Комплексная характеристика белков острой фазы	156
Тема 13.2. Функции крови	162
Раздел 14. БИОХИМИЯ ПОЧЕК	170
Тема 14.1. Исследование нормальной и патологической мочи	170
Раздел 15. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ	179
Тема 15.1. Биотрансформация лекарственных веществ	179
Эталоны ответов к тестовым заданиям	183
Эталоны ответов к ситуационным задачам	186
Рекомендуемая литература	196

ВВЕДЕНИЕ

Данное учебно-практическое пособие содержит информацию по каждой теме в соответствии с программой по курсу биологической химии, 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 современными лекарственными формами, обладающими адресной доставкой. Наиболее актуальным в настоящее время для студентов фармацевтического факультета является рассмотрение нового раздела – «фармацевтическая биохимия». Данный раздел дает представление об основных закономерностях метаболизма биогенных и биотрансформации синтетических лекарственных веществ (ксенобиотиков), знакомит студентов с методами выявления продуктов конъюгации и лекарственным мониторингом. Раздел энзимологии изложен с указанием основных направлений применения ферментов в медицине и фармации. Приведены примеры методов ферментативного анализа биологических субстратов, указаны преимущества иммобилизованных ферментов. В пособии также изложены современные иммуноферментные методы анализа (ИФА), наиболее распространенные и используемые для определения широкого спектра как низкомолекулярных, так и высокомолекулярных соединений – антител, пептидных и стероидных гормонов, фармакологических препаратов, вирусных и бактериальных антигенов, пестицидов и т.д. В данном издании приведены примеры практического применения ДНК-технологий, таких как генная инженерия, лежащих в основе разработок новых лекарственных препаратов в фармацевтической промышленности; полимеразная цепная реакция (ПЦР) как важнейшее достижение в диагностической практике.

Многие разделы учебного пособия включают новую информацию, дополняющую материал, изложенный в учебниках по биологической химии.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АлАТ	– аланинаминотрансфераза
АсАТ	– аспартатаминотрансфераза
ГАМК	– γ -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
НЬ	– 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

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 качественных цветных реакций (биуретовой, ксантопротеиновой, нингидриновой, реакции Фоля) выявления белка и аминокислот.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Понятия «аминокислота», «пептид», «полипептид», «белок». Биологические функции белков в организме, с указанием примеров. Основные физико-химические свойства аминокислот: полярные и неполярные аминокислоты, гидрофобные и гидрофильные, амфотерность, значение функциональных групп аминокислот, определяющих физико-химические свойства. Классификации аминокислот по биологической роли, химическому строению радикала, растворимости радикала в воде. Химическое строение 20 протеиногенных аминокислот. Образование пептидной связи, лежащей в основе построения пептидов и первичной структуры белковой молекулы. Построение пептидов. Аминокислоты – лекарственные препараты.

Вопросы для самоконтроля

1. Какие органические соединения называют пептидами.
2. Какие органические соединения называют полипептидами.
3. Какие органические соединения называют белками.
4. Чем обусловлено разнообразие белков в организме.
5. Классификация аминокислот по химическому строению радикалов.
6. Чем обусловлено разнообразие физико-химических свойств аминокислот.
7. Аминокислоты, характеризующиеся наибольшей гидрофобностью.
8. Аминокислоты, характеризующиеся наибольшей гидрофильностью.
9. Назвать аминокислоты, имеющие при рН 7,0 дополнительный отрицательный заряд.

10. Назвать аминокислоты, имеющие при рН 7,0 дополнительный положительный заряд.

11. Примеры аминокислот, используемых в качестве лекарственных препаратов.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Лабораторная работа

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. H₂SO₄, 7) 1 % раствор CuSO₄, 8) 5 % раствор Pb(CH₃COO)₂, 9) конц. HNO₃.

Материал исследования

1% водный раствор яичного белка, содержащего полный набор аминокислот.

Проведение анализа

В пронумерованные пробирки наливают по 5 капель раствора белка. Руководствуясь указаниями, выполняют 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 Cu²⁺ 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 CuSO₄.

НИНГИДРИНОВАЯ РЕАКЦИЯ

Универсальная реакция для обнаружения любых α-аминогрупп, содержащихся в аминокислотах, пептидах, белках.

Принцип

При нагревании аминокислот с нингидрином происходят окислительное дезаминирование α-аминогрупп и восстановление нингидрина. Восстановленный нингидрин реагирует с аммиаком и другой молекулой окисленного нингидрина с образованием окрашенного продукта сине-фиолетового цвета.

Проведение анализа

Раствор белка смешивают с 5 каплями 0,5 % раствора нингидрина. Пробирки нагревают и кипятят до появления 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 уксусно-кислого 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 использования и в основе методов их количественного определения.

Оформление работы

Результаты оформляют в виде таблицы, указывая характерное окрашивание, а также указывая содержащееся вещество в каждой пробе.

№	Реакции				Объект
	Нингидриновая	Ксантопротеиновая	Фоля	Биуретовая	

ТЕМА 1.2. 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 методом выделения белков в биологическом материале.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Строение белковой молекулы: первичная, вторичная, третичная и четвертичная структуры. Типы конформаций. Химические связи, формирующие различные уровни структуры белка. Четвертичные структуры: комплементарность протомеров, самосборка надмолекулярных структур, кооперативные изменения конформации протомеров. Глобулярные и фибриллярные белки. Физико-химические свойства белков. Молекулярная масса, размеры и форма, растворимость, ионизация, гидратация. Лабильность пространственной структуры белков и их денатурация. Факторы, вызывающие денатурацию и высаливание, их практическое применение. Методы выделения индивидуальных белков: избирательное осаждение солями и органическими растворителями, гель-фильтрация, электрофорез, ионообменная хроматография, аффинная хроматография, на основе специфичности связывания лиганда, специфичности катализа.

Вопросы для самоконтроля

1. Что называют конформацией белка, чем она определяется.
2. Чем обусловлен индивидуальный состав аминокислот в белке, методы его исследования.
3. Первичная структура белка, связи ее формирующие.
4. Вторичная структура белка, связь её формирующая, типы возможных конформаций.
5. Третичная структура белка, связи её формирующую, типы возможных конформаций.
6. Какому уровню структурной организации белка свойственно понятие «олигомер».
7. Какие белки называют мономерными.
8. Какой процесс называется гидратацией.
9. Как называются растворы высокомолекулярных веществ, свойства белковых растворов.

10. Влияние рН среды на стабильность белковых растворов, понятия «ИЭС», «ИЭТ».
11. Методы осаждения белков из растворов, их практическое применение в медицине.
12. Фармакологическая группа лекарственных препаратов, механизм действия которой основан на коагуляции белков, ведущей к гибели бактериальной клетки.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Лабораторная работа

Исследование химической денатурации белков

Денатурация – это метод осаждения белков из раствора, в результате разрушения структуры белковой молекулы (начиная с наивысшего уровня: четвертичной, третичной, вторичной, первичной) приводящее к потере биологической активности. 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 % CH_3COOH , 2) ацетон, 3) 10 % ТХУ, 4) конц. HNO_3 , 5) 1 % CuSO_4 , 6) конц. H_2SO_4 , 7) 5 % $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 8) танин, 9) сульфосалициловая кислота, 10) 10 % NaOH .

Материал исследования

1 % водный раствор яичного белка

Принцип

Денатурация сопровождается разрушением нативной структуры белка, потерей гидрофильности и устойчивостью их в растворе, вследствие чего белок выпадает в осадок.

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	результат
Соли тяжелых металлов:					
	1	Меди сульфат	2	Ионы металлов связываются с функциональными группами аминокислот, в результате чего разрушается пространственная структура белка	
	2	Свинца ацетат	2		

Концентрированные минеральные кислоты:					
	3	Азотная	2	Кислоты вызывают дегидратацию белков, нейтрализуют заряд белка, связываясь с катионными группами.	
	4	Серная	2		
	5	Азотная	10	Исчезновение осадка белка при добавлении избытка серной кислоты обусловлено перезарядкой ионных групп.	
	6	Серная	10		
Органические кислоты:					
	7	Трихлоруксусная	2	Органические кислоты нейтрализуют заряд белка, разрушают водородные связи.	
	8	Сульфосалициловая	2		
Алкалоиды (дубильные вещества):					
	9	Танин	2	Образуются нерастворимые солеобразные соединения с основными аминогруппами основных аминокислот белка	
Органические растворители:					
	10	Ацетон	5	Нарушаются гидрофобные взаимодействия внутри 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.

ТЕМА 1.3. 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 (серповидно-клеточная анемия, наследственные нарушения биосинтеза белков и др.). Реакция открытия белковой и простетической групп позволяет понять состав и строение сложных белков, а также использовать эти данные для количественного определения.

Цель

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

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Классификации белков: по форме молекулы (глобулярные и фибриллярные), по химическому строению (простые и сложные), по биологическим функциям. Строение и свойства простых белков (гистоны, альбумины, глобулины). Сложные белки: нуклеопротеины, хромопротеины, гликопротеины/протеогликаны, липопротеины, фосфопротеины, металлопротеины. Представление о структуре сложных белков, их биологическом значении. Химическое строение простетических групп сложных белков: фрагмент строения первичной структуры нуклеиновых кислот РНК и ДНК, вторичной, третичной структуры; пример моносахаридов и олигосахаридов, гетерополисахаридов (гиалуроновой кислоты, хондроитин-4-сульфата); флавиновых производных (ФМН, ФАД); гема; остатка фосфорной

кислоты, а также общий принцип строения транспортных липопротеинов крови.

Вопросы для самоконтроля

1. Классификация белков по биологическим функциям (примеры).
2. Белки, выполняющие защитную функцию (привести примеры).
3. Белки, выполняющие структурную функцию (привести примеры).
4. Белки, выполняющие регуляторную функцию (привести примеры).
5. Белки, выполняющие каталитическую функцию (привести примеры).
6. Характеристика классификации белков по химическому строению.
7. Наиболее распространенные белки плазмы крови, их характеристика.
8. Типы гистонов, образующих октамерный белковый комплекс в нуклеосоме.
9. Характеристика хромопротеинов, разнообразие их строения и функции, привести примеры белков.
10. Характеристика строения нуклеопротеинов, их разнообразие, локализация в клетке, функции.
11. Характеристика строения и функций фосфопротеинов, привести примеры белков.
12. Характеристика строения и функций металлопротеинов, привести примеры.
13. Сравнительная характеристика строения и биологической роли гликопротеинов и протеогликанов, их локализация.
14. Характеристика транспортных липопротеинов крови, общий принцип их строения.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Лабораторная работа

Выделение и анализ химического состава сложных белков

Для обнаружения белкового и небелковых компонентов сложных белков – муцина и казеиногена, содержащихся в различных объектах (слюне, молоке), используют следующие качественные реакции:

Название реакции	Выявляемый компонент	Принцип реакции	Проведение реакции
Биуретовая реакция	белковый	Пептидная группа образует в щелочной среде с ионами Cu^{2+} комплексное соединение фиолетового цвета	К объекту исследования добавляют 10 капель 10 % NaOH и 1 каплю 1 % CuSO_4
Реакция Молиша	углеводные группы (β -D-рибоза)	При конденсации тимола с гидроксиметилфурфуролом, продуктом дегидратации	К объекту исследования добавляют 2 капли раствора тимола,

		пентоз серной кислотой, развивается красное окрашивание	перемешивают и осторожно по стенке добавляют конц. H_2SO_4 до появления розового кольца в пробирке
Молибденовая проба	фосфорная кислота	Фосфорная кислота, взаимодействуя с раствором молибденово-кислого аммония и азотной кислотой, образует окрашенное комплексное соединение аммония фосфомолибдата лимонно-желтого цвета	К объекту исследования добавляют 20 капель молибденового реактива, кипятят, жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет

Реактивы

1) 1 % раствор тимола в этиловом спирте, 2) 10 % раствор NaOH, 3) молибденовый реактив, 4) конц. H_2SO_4 , 5) 1 % раствор $CuSO_4$, 6) 10 % р-р трихлоруксусной кислоты (ТХУ), 7) 10 % р-р уксусной кислоты.

А. ВЫДЕЛЕНИЕ И АНАЛИЗ ХИМИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ КАЗЕИНОГЕНА МОЛОКА

Материал исследования

Молоко

Проведение анализа

К 2,0 мл молока приливают равный объем дистиллированной воды, перемешивают. Добавляют 2 капли уксусной кислоты. При подкислении молоко свертывается благодаря выпадению в осадок белка казеиногена ($pI=4,7$). Хлопьевидный осадок отфильтровывают.

На фильтре выявляют белковую часть казеиногена, а в фильтрате небелковый компонент, используя качественные реакции.

Б. ВЫДЕЛЕНИЕ И АНАЛИЗ ХИМИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ МУЦИНА СЛЮНЫ

Материал исследования

Слюна

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 выявляют небелковый компонент, используя качественные реакции.

Оформление работы

Результаты работы вносят в таблицу, указывая вывод о составе сложных белков, его принадлежность к группе сложных белков:

Объект исследования	Название реакции	Выявляемый компонент	Окрашивание	Вывод
казеиноген молока				
муцин слюны				

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один или несколько правильных ответов.

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 – NH₂-групп

3. ОСНОВНЫМИ СВОЙСТВАМИ ОБЛАДАЮТ АМИНОКИСЛОТЫ

- 1) лейцин
- 2) треонин
- 3) гистидин
- 4) лизин
- 5) аргинин

4. АРОМАТИЧЕСКОЕ СТРОЕНИЕ ИМЕЮТ АМИНОКИСЛОТЫ

- 1) фенилаланин
- 2) аланин
- 3) триптофан
- 4) тирозин
- 5) метионин

5. ГИДРОКСИЛЬНАЯ ГРУППА ВХОДИТ В СОСТАВ РАДИКАЛА

- 1) аланина
- 2) тирозина
- 3) треонина
- 4) метионина
- 5) серина

6. СЕРОСОДЕРЖАЩИМИ ЯВЛЯЮТСЯ АМИНОКИСЛОТЫ

- 1) глицин
- 2) метионин
- 3) аланин
- 4) цистеин
- 5) лейцин

7. ОТРИЦАТЕЛЬНО ЗАРЯЖЕННЫЕ ГРУППЫ В РАДИКАЛЕ СОДЕРЖАТ

- 1) глицин
- 2) аспарагиновая кислота
- 3) глутамин
- 4) глутаминовая кислота
- 5) гистидин

8. ПОЛОЖИТЕЛЬНО ЗАРЯЖЕННЫЕ ГРУППЫ В РАДИКАЛЕ СОДЕРЖАТ

- 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. ГЛОБУЛЯРНЫМ ПО СТРУКТУРЕ МОЛЕКУЛЫ ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) эластин
- 2) коллаген
- 3) альбумин
- 4) гемоглобин
- 5) глобулин

13. ПРОИЗВОДНЫМИ 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 СОСТАВЕ БЕЛКА

- 1) альбумина
- 2) гистона
- 3) глобулина

15. ЛИЗИН И АРГИНИН ПРЕОБЛАДАЮТ В СОСТАВЕ БЕЛКА

- 1) глобулина
- 2) гистона
- 3) альбумина

16. ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ВОДОЙ БЕЛКИ ОБРАЗУЮТ

- 1) истинные растворы
- 2) коллоидные растворы

17. ГЕМ С ГЛОБИНОВЫМ КОМПОНЕНТОМ СВЯЗЫВАЮТ ОСТАТКИ АМИНОКИСЛОТ

- 1) аланина
- 2) глицина
- 3) гистидина
- 4) тирозина

18. ФОСФОРНУЮ КИСЛОТУ С АПОПРОТЕИНОМ СВЯЗЫВАЮТ ОСТАТКИ АМИНОКИСЛОТ

- 1) лизина
- 2) метионина
- 3) серина
- 4) аланина

РАЗДЕЛ 2. СТРОЕНИЕ, КЛАССИФИКАЦИЯ И РОЛЬ ВИТАМИНОВ

ТЕМА 2.1. ЖИРОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ

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, приводящие 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.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

История открытия витаминов. Понятие «витамины». Классификация витаминов. Алиментарные и вторичные авитаминозы и гиповитаминозы. Гипервитаминозы. Значение витаминов в организме. Строение и биологическое значение витаминов: А (ретинол и каротиноиды), D (кальциферол), К (нафтохиноны), Е (токоферолы), F (эссенциальные жирные кислоты). Витаминзависимые и витаминрезистентные состояния. Биохимическая характеристика патогенеза рахита. Биохимическая характеристика гипервитаминозов А и D (реакции превращения А, D₃ из провитаминов). Схема зрительного цикла и действия ретиноидов в организме. Реакция образования γ -карбоксиглутаминовой кислоты с участием витамина К, её значение.

Вопросы для самоконтроля

1. Какая группа веществ называется витаминами.
2. Какие вещества называются провитаминами (привести примеры превращения провитаминов в витамины).
3. Какие вещества относят к антивитаминам (привести примеры использования антивитаминов в качестве лекарственных средств).
4. Виды дисбаланса витаминов, экзогенные и эндогенные причины гипо- и авитаминозов.
5. Применение витаминов и их антагонистов в клинической практике.
6. Авитаминоз какого витамина сопровождается нарушением работы зрительного цикла, причина проявления клинического симптома.
7. Какой витамин, образуется в коже человека под действием УФ-лучей?
8. При недостаточности какого витамина развивается заболевание рахит?
9. Какой витамин по биологическому действию является антиоксидантом, механизм его действия.
10. Какой витамин по биологическому действию называют «антисклеротическим», биологические функции этого витамина.
11. Понятия «провитамины» и «антивитамины» (привести примеры использования антивитаминов в медицинской практике в качестве лекарственных препаратов).

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 гипо- и авитаминоза	Пищевые источники	Лекарственные формы

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Лабораторная работа

Качественные реакции на жирорастворимые витамины

А. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА РЕТИНОЛ (ВИТАМИН А)

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 (ВИТАМИН Д)

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. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ТОКОФЕРОЛ (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. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ВИКАСОЛ (СИНТЕТИЧЕСКИЙ АНАЛОГ ВИТАМИНА К₁)

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:

Название исследуемого витамина	Реакция обнаружения	окрашивание

ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ЖИРОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ В МЕДИЦИНЕ

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 Д₃ представляет собой масляный раствор, применяемый per os или парентерально для профилактики рахита, при спазмофилии, гипокальциемии, остеомаляции и остеопорозе. В дозах, превышающих 15–20 мкг в день, витамин Д₃ 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 тромбофлебитов, инфаркта миокарда.

ТЕМА 2.2. ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Характеристика водорастворимых витаминов: В₁, В₂, РР, В₅, В₆, В₉, В₁₂, С, Н, их биологические функции, признаки гипо- и авитаминоза, суточная потребность, их роль в построении коферментов. Представление о химической структуре витаминов В₁₂, В_С, (фолиевая кислота), В₅ (пантотеновая кислота), их коферментах. Химическая структура водорастворимых витаминов (В₁, В₂, В₆, РР, С, Н) и их биологически активных (коферментных) форм (ТДФ, ФМН и ФАД, НАД и НАДФ, ПФ). Принцип построения нуклеотидных коферментов: ФМН и ФАД, НАД и НАДФ. Механизмы переноса электронов и протонов от донора к акцептору коферментами НАД (НАДФ), ФМН (ФАД) в составе ферментов (дегидрогеназ), с указанием их окисленных и восстановленных форм.

Вопросы для самоконтроля

1. Роль водорастворимых витаминов в обмене веществ.
2. Какой витамин называют «антипеллагрическим»? Симптоматическая картина его недостаточности, коферменты и их биологические функции.
3. Какие витамины называют «антианемическими»? Признаки их недостаточности, коферменты и их биологическая роль.
4. Какой витамин называют «антисеборейным»? Признаки его недостаточности и биологическая роль в обмене веществ.
5. Какой витамин называют «антидерматитным»? Признаки недостаточности, коферменты и их биологические функции.
6. Какой витамин называют «антиневритным»? Признаки его недостаточности, кофермент и биологическая роль.
7. Какой витамин называют «антискорбутным»? Признаки его недостаточности и биологические функции.
8. Недостаточность какого витамина сопровождается развитием полиневрита, потерей кожной чувствительности, параличом, нарушением деятельности сердечно-сосудистой и пищеварительной систем?
9. Недостаточность какого витамина сопровождается дистрофическими изменениями, желез внутренней секреции (надпочечников и др.), нарушением деятельности нервной системы (невритами, параличами), дистрофическими изменениями в сердце, почках, депигментацией и выпадением волос.
10. Недостаточность какого витамина сопровождается развитием воспалительных процессов на слизистой оболочке ротовой полости? Биологические функции витамина, коферменты.

11. Недостаточность какого витамина сопровождается нарушением кроветворения? Активные формы витамина, биологическая роль, суточная потребность, пищевые источники.
12. Какие витамины участвуют в биологическом окислении веществ? Механизм действия их коферментов.

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)	Химическое строение кофермента	Суточная доза	Признаки недостаточности (гипо- и авитаминоза)	Биологическая роль (участие кофермента в процессах обмена веществ)	Пищевые источники	Лекарственные формы

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Лабораторная работа

Качественные реакции на водорастворимые витамины

Реактивы

1) конц. HCl; 2) 1 % раствор FeCl₃; 3) 10 % раствор тиомочевины; 4) 10 % CH₃COOH; 5) 5 % раствор Cu(CH₃COO)₂; 6) цинк металлический; 7) 0,01 % раствор метиленового синего.

Оборудование

Электроплитка, беззольные фильтры.

Материал исследования

0,025 % раствора рибофлавина, 5 % раствор пиридоксина гидрохлорида, никотиновая кислота, таблетки рибофлавина, витамин В₁₂, 1 % раствор аскорбиновой кислоты.

А. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА РИБОФЛАВИН (ВИТАМИН В₂)

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 В₂ добавляют 5 капель концентрированной HCl и гранулу металлического цинка. Жидкость окрашивается в розовый цвет, а затем обесцвечивается.

Б. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА НИКОТИНОВУЮ КИСЛОТУ (ВИТАМИН РР)

Принцип

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

Материал исследования: порошок никотиномаида.

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 уксусно-кислой меди. Жидкость становится мутной. При стоянии и постепенном охлаждении раствора выпадает синий осадок медной соли никотиновой кислоты.

В. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ПИРИДОКСИН (ВИТАМИН В₆)

Принцип

Витамин В₆ с FeCl₃ образует комплексную соль красного цвета типа фенолята железа.

Материал исследования

1 % раствор витамина В₆.

Проведение анализа

К 5 каплям раствора витамина В₆ прибавляют равное количество раствора FeCl₃. Развивается красное окрашивание.

Г. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ЦИАНКОБАЛАМИН (ВИТАМИН В₁₂)

Принцип

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

Материал исследования

минерализат витамина В₁₂.

Проведение анализа

На беззольный фильтр наносят 2–3 капли тиомочевины, высушивают над плиткой. Затем на фильтр наносят 1–2 капли минерализата витамина В₁₂ и вновь высушивают. На фильтре по краям пятна появляется зеленое окрашивание, свидетельствующее о наличии кобальта.

Д. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА АСКОРБИНОВУЮ КИСЛОТУ (ВИТАМИН С)

Принцип

Аскорбиновая кислота обладает восстанавливающими свойствами, она способна восстанавливать метиленовый синий, окисляясь до дегидроаскорбиновой кислоты, в результате метиленовый синий восстанавливается до бесцветных лейкосоединений.

Материал исследования

1 % раствор аскорбиновой кислоты.

Проведение анализа

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

Регистрируют принципы методов определения и результаты анализа в виде таблицы:

Исследуемый витамин	Принцип метода выявления	Проведение анализа	Результат

ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ В МЕДИЦИНЕ

Витамин В₁ широко применяется в медицинской практике для лечения различных нервных заболеваний (полиневрита, неврозов), сердечно-сосудистых расстройств (гипертонии, склероза коронарных сосудов) и др. Фосфорилированная форма витамина В₁ – кокарбоксилаза – применяется при патологических состояниях, связанных с нарушением углеводного обмена, почечной недостаточности, нарушениях коронарного кровообращения.

Витамин В₂. В медицинской практике применяют как витамин В₂, так и его коферментные формы. Исходный рибофлавин показан при гипо- и авитаминозах В₂, при конъюнктивитах, язвах роговицы и катаракте. Рибофлавин-моноклеотид применяют при различных кожных заболеваниях, таких как дерматозы, нейродермиты, себорея, фолликулярная волчанка. Флавионат (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 В₆. В медицинской практике используют как витамин В₆, так и его коферментные формы. Пиридоксин применяют при токсикозах у беременных, атеросклерозе, нервных и кожных заболеваниях. Пиридоксальфосфат более эффективен, особенно при кожных заболеваниях.

Витамин В₁₂ применяют для лечения некоторых видов анемий, причем наибольший эффект проявляется при сочетанном его применении с фолиевой кислотой. Кроме того, витамин В₁₂ показан при патологиях печени, нервной системы, кожных заболеваниях.

Фолиевая кислота в сочетании с витамином В₁₂ 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. Витамины 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.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. ПРИ ЧРЕЗМЕРНОМ ПОСТУПЛЕНИИ ВИТАМИНА РАЗВИВАЕТСЯ

- 1) авитаминоз
- 2) гиповитаминоз
- 3) гипервитаминоз

2. «АНТИКСЕРОФТАЛЬМИЧЕСКИМ» НАЗЫВАЮТ ВИТАМИН

- 1) Д
- 2) Е
- 3) F
- 4) А

3. «АНТИРАХИТИЧЕСКИМ» НАЗЫВАЮТ ВИТАМИН

- 1) А
- 2) Д
- 3) Е
- 4) К

4. «АНТИСКЛЕРОТИЧЕСКИМ» НАЗЫВАЮТ ВИТАМИН

- 1) Д
- 2) РР
- 3) F
- 4) К

5. ЖИРОРАСТВОРИМЫМ ЯВЛЯЕТСЯ ВИТАМИН

- 1) РР
- 2) С
- 3) А
- 4) Н

6. РАХИТ РАЗВИВАЕТСЯ ПРИ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ВИТАМИНА

- 1) Е
- 2) А
- 3) Д
- 4) К

7. В РЕГУЛЯЦИИ ОБМЕНА КАЛЬЦИЯ И ФОСФАТОВ УЧАСТВУЕТ
ВИТАМИН

- 1) Д
- 2) К
- 3) Е
- 4) РР

8. СЕБОРЕЯ РАЗВИВАЕТСЯ ПРИ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ВИТАМИНА

- 1) А
- 2) К
- 3) Н
- 4) Е

9. АКТИВАЦИЮ ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАЮЩЕЙ СИСТЕМЫ КРОВИ
ОСУЩЕСТВЛЯЕТ ВИТАМИН

- 1) С
- 2) РР
- 3) А
- 4) К

10. ЗАБОЛЕВАНИЕ «БЕРИ-БЕРИ» РАЗВИВАЕТСЯ ПРИ ДЕФИЦИТЕ
ВИТАМИНА

- 1) В₁
- 2) РР
- 3) Н
- 4) С

11. ТЕТРАГИДРОФОЛИЕВАЯ КИСЛОТА (ТГФК) УЧАСТВУЕТ В ПЕРЕНОСЕ ГРУПП

- 1) метильных
- 2) ацетильных
- 4) фосфатных

12. ВИТАМИН В₆ ОБРАЗУЕТ КОФЕРМЕНТЫ

- 1) никотинамидные
- 2) пиридоксальные
- 3) флавиновые
- 4) кобамидные

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

Задача № 1

Варфарин – препарат, применяемый для борьбы с грызунами, при его приеме у них возникают сильные кровотечения.

Указать механизм действия варфарина.

Задача № 2

У больного нарушено переваривание и всасывание липидов, что послужило причиной развития недостаточности витаминов.

Объяснить недостаточность каких витаминов следует ожидать? Почему?

Задача № 3

У новорожденного обильные подкожные кровоизлияния, кровь в кале, носовые кровотечения.

Объяснить недостаточность какого витамина наблюдается? Какие лекарственные препараты необходимо использовать?

Задача № 4

При приеме избыточного количества витамина развилась интоксикация, с последующей деминерализацией костей и их переломами. Уровень кальция и фосфатов в крови резко повысился.

Назвать витамин и его суточную потребность, объяснить опасность гипervитаминоза.

Задача № 5

У больного закупорка желчного протока. Предстоит операция.

Объяснить, какой витамин следует назначить до операции? Почему?

Задача № 6

Больной плохо видит в сумерках, слабо ориентируется при переходе от света к темноте.

Объяснить недостаточность какого витамина наблюдается? Какие лекарственные препараты следует использовать?

Задача № 7

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.

Объяснить, почему бактерии нуждаются в фолиевой кислоте?

Задача № 8

У ребенка после длительного употребления сырых яиц развился дерматит.

Укажите причину и рекомендуйте лекарственный препарат.

Задача № 9

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.

Объяснить, почему такое питание приводило к недостаточности никотиновой кислоты?

Задача № 10

Длительное лечение антибиотиками и сульфаниламидными препаратами вызвало развитие авитаминозов.

Объяснить причину развития авитаминозов. Какие лекарственные препараты необходимо использовать?

Задача № 11

Через год после резекции желудка у больного развилась анемия. *Указать причину и рекомендовать лекарственный препарат.*

Задача № 12

При потреблении пищи с высоким содержанием аминокислоты триптофана суточная потребность взрослого человека в никотиновой кислоте уменьшилась.

Объяснить метаболическую взаимосвязь между никотиновой кислотой и триптофаном?

Задача № 13

При длительном лечении туберкулеза изониазидом у больного развились эпилептиформные припадки, наблюдалось повышение возбудимости центральной нервной системы и периодические судороги.

Объяснить причину. Какой витамин следует использовать?

Задача № 14

У больного с хроническим заболеванием печени и желчевыводящих путей развилась остеомалация (размягчение костей с деформацией скелета).

Объяснить 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 особенностей ферментативного катализа и исследование практическим путем свойств ферментов.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Общее представление о катализе, понятия «энергетический барьер», «энергия активации». Химическая природа ферментов. Структурно-функциональная организация ферментов: простые и сложные ферменты, полиферментные комплексы. Понятие об апоферменте, кофакторе, холоферменте. Классификация коферментов. Химическое строение витаминных коферментов: НАД, НАДФ, ФМН, ФАД, ТДФ, ПФ. Этапы механизма действия ферментов. Основные свойства ферментов: специфичность, термолабильность, зависимость активности от рН среды. Графики зависимости скорости ферментативной реакции от температуры, рН среды, концентрации фермента, концентрации субстрата. Ингибирование ферментов: обратимое, необратимое, конкурентное. Регуляция каталитической активности ферментов, способы активации: аллостерические механизмы, ковалентная модификация, ограниченный протеолиз, белок-белковое взаимодействие. Применение ингибиторов ферментов в качестве лекарств (примеры). Изоферменты: использование в медицине (примеры).

Вопросы для самоконтроля

1. Общее представление о катализе, понятия: «свободная энергия», «энергетический барьер», «энергия активации».
2. Структурная организация ферментов, понятия: «апофермент», «кофактор», «кофермент», «холофермент».
3. Классификация кофакторов и их роль в катализе, примеры химического строения витаминных коферментов.
4. Функциональная организация ферментов, роль активного и аллостерического центров в ферментативном катализе.
5. Этапы ферментативного катализа, особенности гипотез Фишера «ключ-замок», Кошленда «рука-перчатка» (или индуцированного соответствия).

6. Основные свойства ферментов: специфичность, термолабильность, зависимость активности от pH среды и др.
7. Особенности кинетики ферментативного катализа в зависимости от изменения количества фермента и субстрата.
8. Способы регуляция ферментативной активности (аллостерические механизмы, ковалентная модификация, путем фосфорилирования/дефосфорилирования, белок-белковое взаимодействие, частичный или ограниченный протеолиз).
9. Виды ингибирования ферментов (обратимое конкурентное и неконкурентное, необратимое), применение ингибиторов ферментов в качестве лекарственных препаратов.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Лабораторная работа 1 Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры

Исследование зависимости скорости ферментативной реакции от температуры на примере изменения активности амилазы слюны(фермент) при действии на крахмал (субстрат).

Реактивы

- 1) 1 % раствор крахмала, 2) раствор Люголя (йод содержащий)

Материал исследования

Слюна, разведенная 1:10 (источник α -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 4 пробирки (1–4-я) вносят по 10 капель крахмала. В следующие 4 пробирки (5, 6, 7, 8) вносят по 10 капель разведенной слюны (раствор α -амилазы). Пробирки делят по парам – 1–5-я, 2-6-я, 3–7-я, 4–8-я 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 пару – в кипящую водяную баню (100°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:

№ проб	Температура инкубации	Окраска с йодом	Скорость реакции
1	0°C		
2	20°C		
3	38–40°C		
4	100°C		

Лабораторная работа 2

Специфичность действия ферментов

Реактивы

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

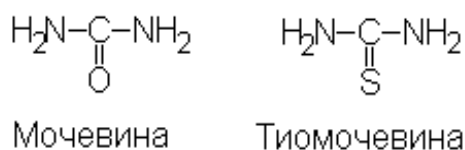
Материал исследования

Препарат уреазы; слюна, разведение 1:10 (источник α -амилазы).

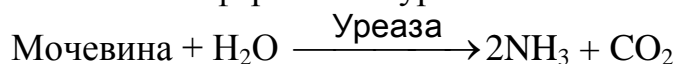
А. ОБНАРУЖЕНИЕ АБСОЛЮТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТА УРЕАЗЫ

Принцип

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



Действие фермента обнаруживается по изменению окраски индикатора фенолфталеина в щелочной среде, которая создается в результате выделения аммиака 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 2 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 гидролизоваться до мальтозы, которая имеет свободную альдегидную группу и обладает восстанавливающими свойствами, поэтому при взаимодействии с реактивом Фелинга появляется красное окрашивание («+» реакция).

Проведение анализа

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

Берут 2 пробирки: в одну добавляют 10 капель крахмала, в другую – 10 капель раствора сахарозы.

Затем в каждую пробирку вносят по 5 капель разбавленной слюны, перемешивают и ставят в водяную баню (37⁰С) 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 α -амилазы.

ТЕМА 3.2. КЛАССИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ

По типу катализируемой реакции все ферменты делят на 6 классов.

I КЛАСС. ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ

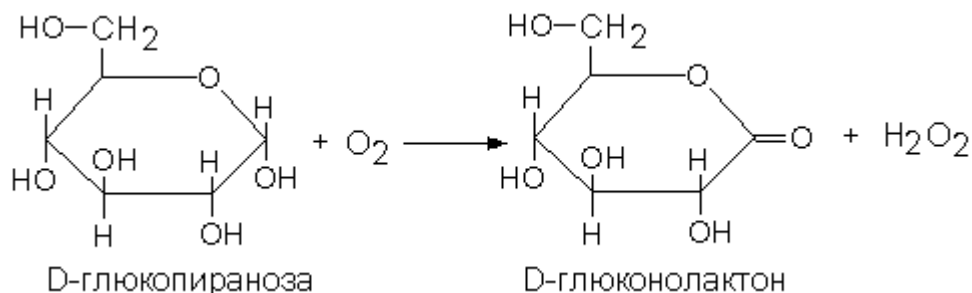
- ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции, лежащие в основе биологического окисления, класс насчитывает 17 подклассов.

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:



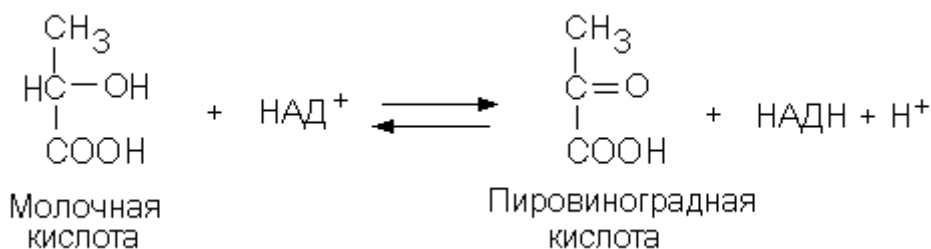
Фермент: глюкозооксидаза

Кофермент: ФАД

Витамин: рибофлавин (В₂)

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

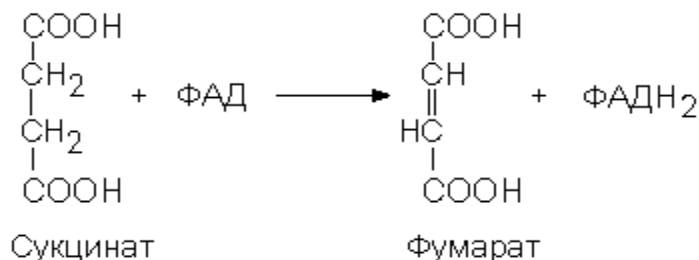


Фермент: лактатдегидрогеназа

Кофермент: НАД

Витамин: никотинамид (РР)

Пример 2

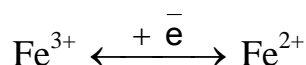


Фермент: сукцинатдегидрогеназа

Кофермент: ФАД

Витамин: рибофлавин (В₂)

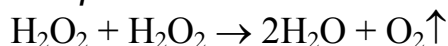
1.2. Цитохромы – ферменты, катализирующие перенос электронов. Являются по химическому строению гемопротеинами, отличающимися друг от друга не только строением белкового компонента, но и простетическими группами. В ходе каталитического процесса валентность железа, входящего в состав гема цитохромов, обратимо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



Цитохромы b, c₁, c, a и a₃ выполняют функцию переноса электронов в дыхательной цепи митохондрий. Цитохром P₄₅₀ – 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



Фермент: глутатионпероксидаза

II КЛАСС. ТРАНСФЕРАЗЫ

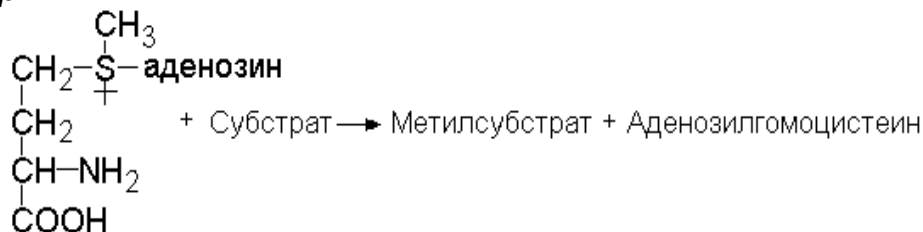
- ферменты, катализирующие реакции переноса различных групп от одного субстрата (донор) к другому (акцептор), участвуют в реакциях взаимопревращений различных веществ, обезвреживания природных и чужеродных соединений.

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

Подклассы:

2.1. Ферменты, переносящие одноуглеродные остатки: метила (–CH₃), формила (–COH), метилена (=CH₂) и др.

Пример



Активная форма метионина

Фермент: Метилтрансфераза

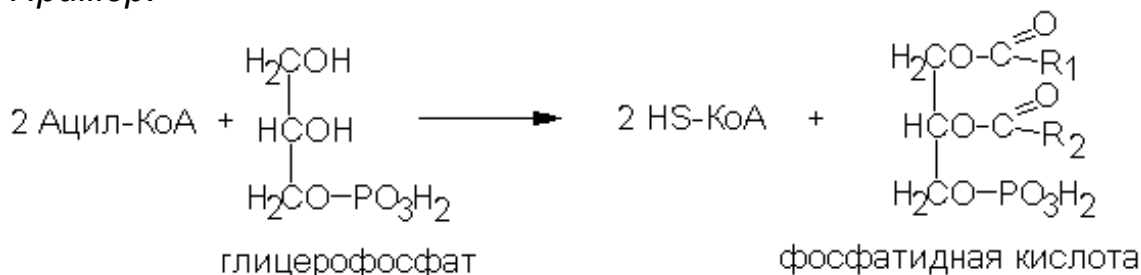
Кофермент: Тетрагидрофолиевая кислота

Витамин: Фолиевая кислота (B₉)

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

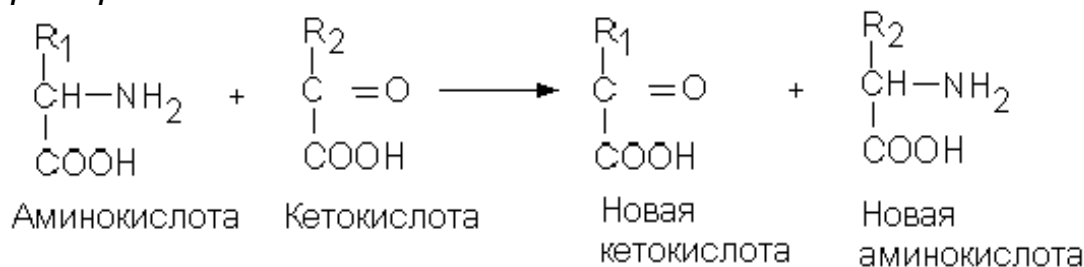
Кофермент: Кофермент А

Витамин: Пантотеновая кислота (В₅)

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

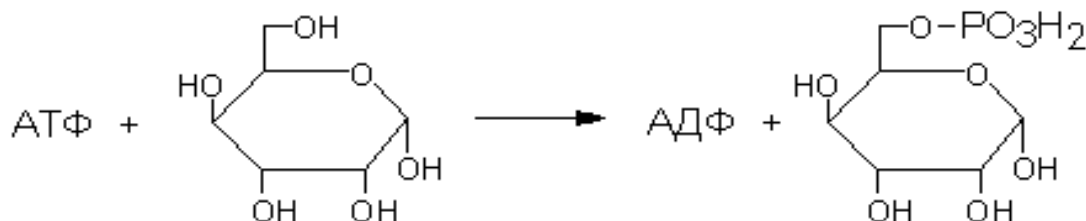
Кофермент: Пиридоксальфосфат

Витамин: Пиридоксин (В₆)

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 Mg²⁺

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

III КЛАСС. ГИДРОЛАЗЫ

- ферменты, катализирующие реакции разрыва внутримолекулярных связей в субстрате (за исключением С-С связей) путем присоединения элементов H_2O . Класс насчитывает около 460 ферментов, подразделяется на 11 подклассов.

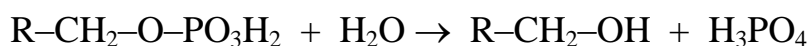
Гидролазы сосредоточены в основном в желудочно-кишечном тракте и в лизосомах клеток тканей. Осуществляют распад макромолекул, образуя легко абсорбируемые мономеры.

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).

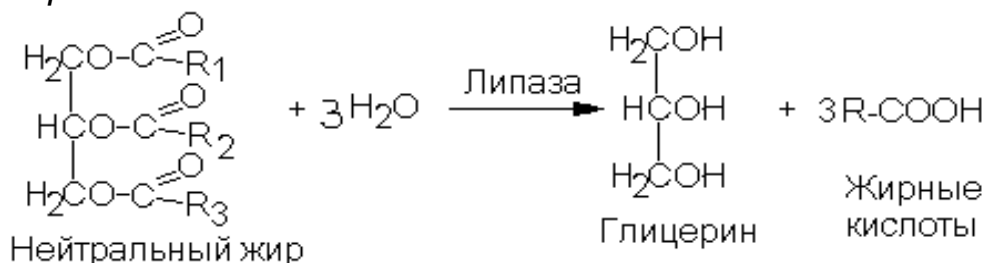
Пример:



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 сложных 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 α -амилазу (слюнную и поджелудочную), осуществляющую гидролиз α -1,4-гликозидной связи в крахмале, гликогене и т.д.

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

3.3. Пептидгидролазы – ферменты, гидролизующие пептидные связи.

а) *Эндопептидазы* гидролизуют внутренние пептидные связи в белковой молекуле.

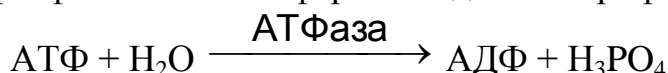
К эндопептидазам относят пепсин – фермент желудочного сока; катепсин I – фермент, аналогичный пепсину, находится в лизосомах клетки; трипсин – фермент панкреатического сока; катепсин II – лизосомальный аналог трипсина; химотрипсин – фермент панкреатического сока.

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):



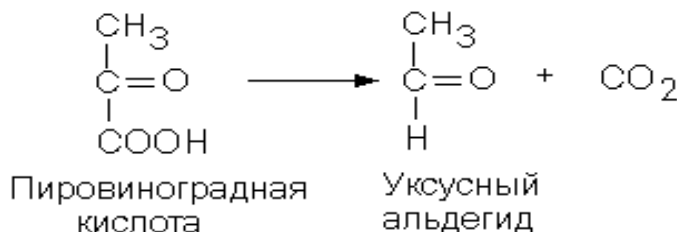
IV КЛАСС. ЛИАЗЫ

- ферменты, катализирующие реакции разрыва C–O, C–C, C–N и других связей, а также обратимые реакции отщепления различных групп субстратов негидролитическим 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: Пируватдекарбоксилаза

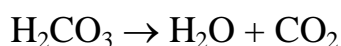
Кофермент: Тиаминдифосфат (ТДФ)

Витамин: Тиамин (B₁)

Биохимическая функция: Ферменты участвуют в синтезе и распаде промежуточных продуктов обмена с образованием конечных продуктов: CO₂, H₂O, NH₃.

4.2. Лиазы, разрывающие связь C–O.

Пример:



Фермент: Карбоангидраза

Кофермент: Содержит Zn.

V КЛАСС. ИЗОМЕРАЗЫ

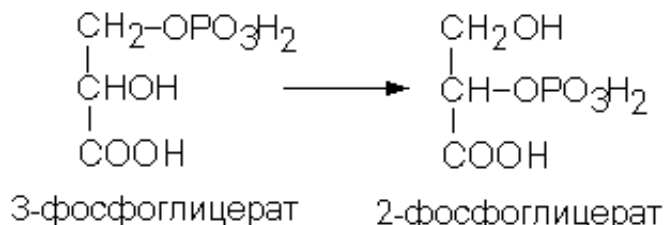
- ферменты, катализирующие изомерные превращения в пределах одной молекулы. Класс насчитывает более 80 ферментов. Изомеразы – сложные

ферменты. К их коферментам относятся пиридоксальные, кобамидные, пептидные (глутатион), фосфаты моносахаридов (глюкозо-1,6-дифосфат) и др.

Подклассы.

5.1. Мутазы – внутримолекулярные трансферазы.

Пример:

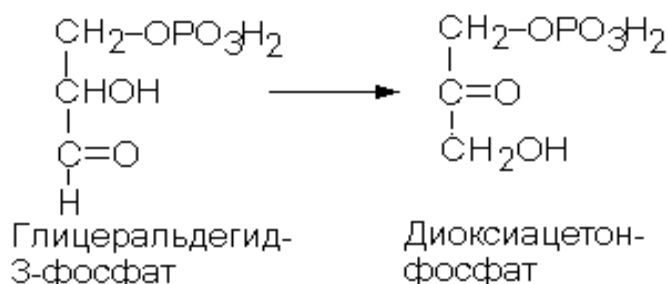


Фермент: Фосфоглицеромутаза

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

5.2. Внутримолекулярные оксидоредуктазы

Пример:



Фермент: Триозофосфатизомераза

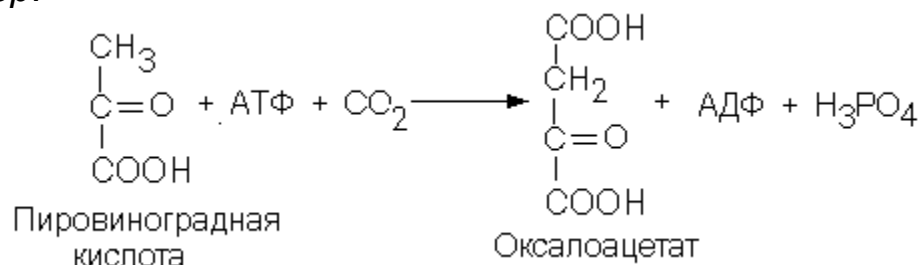
VI КЛАСС. ЛИГАЗЫ (СИНТЕТАЗЫ)

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

Подклассы.

6.1. Ферменты, синтезирующие С–С связи.

Пример:



Фермент: Пируваткарбоксилаза

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

Цель

изучение классификации ферментов, освоение метода определения активности α -амилазы.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Принципы современной номенклатуры и классификации ферментов. Классы ферментов: оксидоредуктазы; трансферазы; гидролазы; лиазы; изомеразы; лигазы (синтетазы). Общая характеристика каждого класса, биохимическая роль, основные подклассы. Строение ферментов и коферментов, знать химическую структуру ТДФ, ФМН и ФАД, НАД и НАДФ, ПФ. Примеры биохимических реакций, катализируемых отдельными представителями каждого класса ферментов. Механизмы участия ферментов в катализе окислительно-восстановительных и др. реакций, в частности переноса электронов и протонов от донора к акцептору коферментами НАД (НАДФ), ФМН (ФАД) в составе дегидрогеназ. Принципы количественного определения активности ферментов. Единицы активности ферментов. Основные направления энзимологии, их практическое значение. Первичные и вторичные энзимопатии. Ферменты в клинической лабораторной диагностике. Ферменты – лекарственные препараты.

Вопросы для самоконтроля

1. Какой принцип лежит в основе деления ферментов на классы?
2. Принципы современной номенклатуры ферментов (привести примеры).
3. Оксидоредуктазы, строение, основные подклассы, биологическая роль, пример химической реакции.
4. Трансферазы, основные подклассы, биологическая роль, пример химической реакции.
5. Гидролазы, строение, основные подклассы, биологическая роль, пример химической реакции.
6. Лиазы, строение, основные подклассы, биологическая роль, пример химической реакции.
7. Изомеразы, строение, основные подклассы, биологическая роль, пример химической реакции.
8. Лигазы, строение, основные подклассы, биологическая роль, пример химической реакции.
9. Принципы количественного определения активности ферментов, единицы активности ферментов.
10. Основные направления энзимотерапии, привести примеры практического использования ферментов и их ингибиторов в медицине.
11. Основные принципы энзимодиагностики, привести примеры.
12. Причины возникновения первичных и вторичных энзимопатий, привести примеры.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Лабораторная работа

Количественное определение активности α -амилазы

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

Реактивы

1) крахмальный субстрат в виде 0,04 % водного раствора, 2) 0,1н основной раствор йода; 3) 0,01н рабочий раствор: 25 г KF растворяют в 50 мл основного раствора йода и доводят дистиллированной водой до 500 мл.

Оборудование

Микроколориметр МКМФ-02М (рис. 1) предназначен для измерения коэффициента пропускания растворов при биохимическом анализе, определения оптической плотности и концентрации исследуемых биопроб.



Рис. 1. Микроколориметр МКМФ-02М

Материал исследования

Сыворотка крови, моча

Принцип

α -Амилаза катализирует гидролиз α -1,4 гликозидных связей крахмала. Количество оставшегося крахмала, пропорциональное каталитической активности фермента, определяют по цветной реакции с йодом.

Проведение анализа

	ОПЫТ, мл	КОНТРОЛЬ, мл
Раствор субстрата	1,0	1,0
	Инкубируют при 37 ⁰ С в течение 5 мин	
Сыворотка	0,02	–
	Инкубируют при 37 ⁰ С точно 5 мин	
Раствор йода	1,0	1,0

Холодная дистиллированная вода	8,0	8,0
	Перемешивают. Измеряют оптическую плотность опытного и контрольного растворов против воды при 650–670 нм. Кювета 1,0 см	

Расчет

$$\text{Активность амилазы, г/л/ч} = \frac{E_k - E_0}{E_k} \times 240$$

Нормальные величины

Сыворотка	16–30 г/л/ч
Моча	28–160 г/л/ч

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:

- 1) применение ферментов в качестве заместительной терапии;
- 2) для удаления нежизнеспособных тканей;
- 3) парентеральное применение ферментативных препаратов;
- 4) использование ингибиторов ферментов;
- 5) как препараты системной терапии.

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 и 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* (Вобэнзим, Флогэнзим, Вобэ-мугос Е) 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 неадьювантной 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.

В настоящее время разработаны методы иммобилизации ферментов, которые позволяют обеспечить адресную доставку. 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 α -амилазы или липазы свидетельствует о наличии острого панкреатита, а лактатдегидрогеназы – инфаркта миокарда, увеличение в сыворотке крови активности кислой фосфатазы – о наличии 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 клиничко-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 ограниченно 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; а также 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- β -стероидгидроксилазу и стероиддегидрогеназу.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один или несколько правильных ответов.

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. ФЕРМЕНТ ПАНКРЕАТИЧЕСКАЯ АМИЛАЗА ИМЕЕТ ОПТИМУМ

- 1) 1,5–2,5
- 2) 4–5
- 3) 6–7
- 4) 8–9
- 5) 10–11

5. ФЕРМЕНТ АРГИНАЗА ИМЕЕТ ОПТИМУМ PH

- 1) 1,5–2
- 2) 9,5–10
- 3) 7,5–8
- 4) 3,5–4
- 5) 9,5–10

6. БОЛЬШИНСТВО ФЕРМЕНТОВ МАКСИМАЛЬНО АКТИВНЫ ПРИ ЗНАЧЕНИИ PH

- 1) 1,5–2
- 2) 8–9
- 3) 7,4

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 ЯВЛЯЕТСЯ КОФЕРМЕНТОМ

- 1) трансфераз
- 2) оксидоредуктаз
- 3) гидролаз
- 4) лиаз
- 5) лигаз

10. ТЕТРАГИДРОФОЛИЕВАЯ КИСЛОТА УЧАСТВУЕТ В ПЕРЕНОСЕ ГРУПП

- 1) метильных
- 2) ацетильных
- 3) одноуглеродных
- 4) фосфатных

11. ВИТАМИН В₆ ОБРАЗУЕТ КОФЕРМЕНТЫ

- 1) никотинамидные
- 2) пиридоксальные
- 3) флавиновые
- 4) кофермент КоА
- 5) кобамидные

12. ГЛУТАТИОН УЧАСТВУЕТ В КАТАЛИЗЕ РЕАКЦИЙ

- 1) переноса метильных групп
- 2) окисления α -кетоглутаровой кислоты
- 3) обратимого превращения дисульфидных групп в сульфгидрильные
- 4) переноса фосфатных групп

13. АКТИВНУЮ ФУНКЦИЮ В КОФЕРМЕНТЕ КоА ВЫПОЛНЯЕТ

- 1) аденозин-3'-фосфат
- 2) пантотеновая кислота
- 3) β -аланин

14. В ПЕРЕНОСЕ АМИНОГРУППЫ УЧАСТВУЕТ КОФЕРМЕНТ

- 1) тиаминдифосфат
- 2) ФМН
- 3) пиридоксальфосфат
- 4) биотин
- 5) кофермент А

15. В СОСТАВ ФЕРМЕНТОВ ДЕГИДРОГЕНАЗ ВХОДИТ КОФЕРМЕНТ

- 1) пиридоксальфосфат
- 2) биотин
- 3) НАД
- 4) ТГФК
- 5) кофермент А

16. ФЕРМЕНТЫ ПРОТЕИНАЗЫ ИСПОЛЬЗУЮТСЯ В МЕДИЦИНЕ ДЛЯ

- 1) очистки ран и участков омертвевшей ткани
- 2) лечения злокачественных новообразований
- 3) заместительной терапии при нарушении переваривания в случаях их недостаточности
- 4) специфического разрушения некоторых метаболитов в аппаратах «искусственная почка»

17. ПРЕИМУЩЕСТВО ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ
ЗАКЛЮЧАЕТСЯ В

- 1) предотвращении выхода ферментов из капсулы
- 2) повышении их стабильности
- 3) ослаблении антигенных свойств ферментов

РАЗДЕЛ 4. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

ТЕМА 4.1. СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Актуальность

Нуклеиновые кислоты – высокомолекулярные органические соединения, представляющие собой полинуклеотидную последовательность, 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 °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 -NH₂). 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 со спектрофотометрическим методом количественного определения нуклеиновых кислот.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Понятия «нуклеиновая кислота», «нуклеотид», «нуклеозид». Номенклатура и разнообразие нуклеотидов. Строение и уровни организации

нуклеиновых кислот. Химическое строение нуклеотидов: рибонуклеотидов, дезоксирибонуклеотидов. Химическое строение первичной структуры ДНК и РНК, типы межнуклеотидных связей. Характеристика вторичной структуры ДНК, связи стабилизирующие двойную спираль ДНК, комплементарность оснований. Характеристика третичной структуры ДНК, структурная организация ДНК в хроматине ядра клеток. Характеристика вторичной и третичной структуры тРНК. Функциональные формы РНК (м-РНК, т-РНК, р-РНК), их биологические функции. Физико-химические свойства нуклеиновых кислот.

Вопросы для самоконтроля

1. Какие органические структуры называют нуклеиновыми кислотами.
2. Чем обусловлено разнообразие нуклеотидов в составе нуклеиновых кислот.
3. Отличие рибонуклеотидов и дезоксирибонуклеотидов, перечислить их разнообразие.
4. Строение первичной структуры нуклеиновых кислот РНК и ДНК, связь ее формирующая.
5. Особенности вторичной структуры ДНК, связи ее стабилизирующие, комплементарность оснований.
6. Особенности третичной структуры ДНК, структурная организация ДНК в хроматине ядра клеток, типы гистонов и их роль в построении.
7. Вторичная и третичная структуры тРНК, биологическое значение.
8. Какое свойство нуклеиновых кислот называют «гиперхромным эффектом».

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Лабораторная работа 1

Спектрофотометрический метод определения концентрации нуклеиновых кислот

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 (рис. 2).

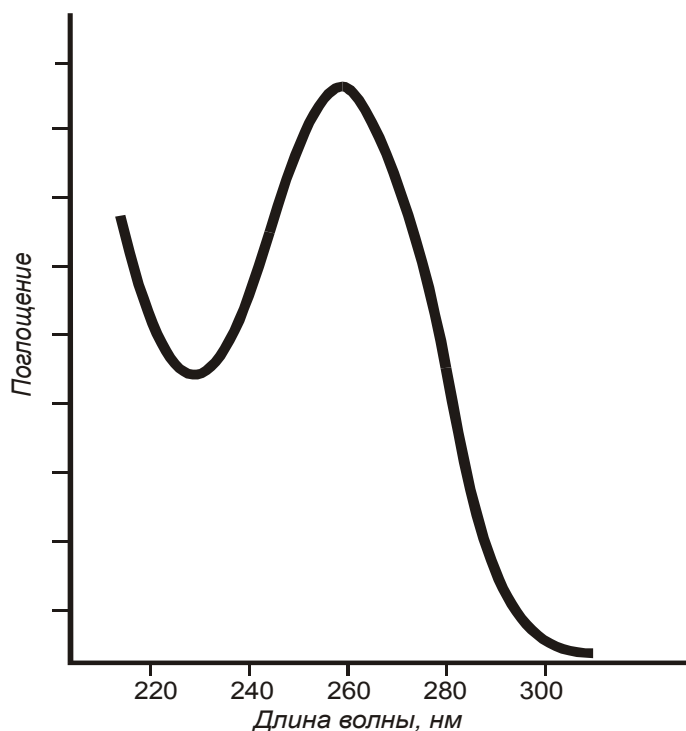


Рис. 2. Кривая поглощения в ультрафиолете раствора натриевой соли дрожжевой РНК с максимумом поглощения при 260 нм и минимумом при 230 нм

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

В то же 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.

Соответственно, формула для расчета концентрации ДНК:

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

О чистоте препарата нуклеиновой кислоты судят по соотношению оптических плотностей ее раствора при длинах волн, характеризующих пик светопоглощения 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 светопоглощения

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

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

Реактивы

Стандартные растворы ДНК (чистый и содержащий примеси белка)

1 н раствор HClO_4 (хлорная кислота, имеет низкую поглощающую способность в ультрафиолетовой области спектра).

Оборудование

Спектрофотометр СФ-46 (рис. 3). Данный прибор предназначен для измерения спектральных коэффициентов пропускания жидких и твердых веществ в области спектра от 190 до 1100 нм.



Рис. 3. Спектрофотометр СФ-46

Проведение анализа

Пробирка 1 – содержит раствор чистой нативной ДНК (стандартный раствор разбавленный в 2 раза).

Пробирка 2 – содержит раствор чистой гидролизованной в HClO_4 ДНК (для этого в пробирке к 1,5 мл раствора ДНК добавляют 1,5 1 н раствора HClO_4 и проводят гидролиз в кипящей водяной бане в течение 20 мин).

Пробирка 3 – содержит раствор ДНК гидролизованной в HClO_4 , также как в пробирке 2 с примесью белка.

Измеряют оптическую плотность растворов, содержащихся в пробирках 1, 2 и 3 при 260 нм, 270 нм и 290 нм против 0,5 н раствора HClO_4 .

Результаты заносят в таблицу.

Номер пробирки	Содержимое	E ₂₆₀	E ₂₇₀	E ₂₉₀	E ₂₆₀ / E ₂₇₀	E ₂₆₀ / E ₂₉₀
1	Раствор чистой нативной ДНК					
2	Раствор чистой гидролизованной ДНК			—	—	—
3	Раствор гидролизованной ДНК с примесью белка					

На основании полученных результатов, делают выводы:

1. О наличии «гиперхромного эффекта» в гидролизованных растворах ДНК (сравнить поглощение при 260 нм в пробирках № 1 и 2).
2. О чистоте препаратов ДНК в пробирках № 2 и 3.
3. Рассчитывают концентрацию ДНК в пробирке № 2, используя формулу:

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

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

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. ПРИ ПОЛНОМ ГИДРОЛИЗЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ОБРАЗУЮТСЯ
 - 1) пуриновые основания
 - 2) нуклеотиды
 - 3) нуклеозиды
 - 4) фосфорная кислота
2. В СОСТАВ НУКЛЕОТИДОВ РНК ВХОДЯТ АЗОТИСТЫЕ ОСНОВАНИЯ
 - 1) аденин
 - 2) тимин
 - 3) цитозин
 - 4) урацил
3. В СОСТАВ НУКЛЕОТИДОВ ДНК ВХОДЯТ АЗОТИСТЫЕ ОСНОВАНИЯ
 - 1) гуанин
 - 2) аденин
 - 3) тимин
 - 4) цитозин

4. В СОСТАВ НУКЛЕОТИДОВ ДНК ВХОДИТ УГЛЕВОД

- 1) β -D-глюкопираноза
- 2) β -D-фруктофураноза
- 3) β -D-рибофураноза
- 4) β -D-дезоксирибофураноза
- 5) D-арабиноза

5. ПО ХИМИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЕ НУКЛЕОЗИДАМИ ЯВЛЯЮТСЯ

- 1) аденозин
- 2) тимидиндифосфат
- 3) аденозинмонофосфат
- 4) циклическая адениловая кислота
- 5) цитидин

6. ПО ХИМИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЕ НУКЛЕОТИДАМИ ЯВЛЯЮТСЯ

- 1) дезоксигуанозин
- 2) уридин-5'-фосфорная кислота
- 3) дезоксцитидин-5'-фосфорная кислота
- 4) уридин
- 5) адениловая кислота

7. РИБОНУКЛЕОЗИДТРИФОСФАТАМИ ЯВЛЯЮТСЯ

- 1) АДФ
- 2) ГТФ
- 3) ЦТФ
- 4) АТФ
- 5) УМФ

8. ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОЗИДДИФОСФАТАМИ ЯВЛЯЮТСЯ

- 1) дГДФ
- 2) дАТФ
- 3) УДФ
- 4) дЦТФ

9. 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. ЦИТОЗИН ОБРАЗУЕТ КОМПЛЕМЕНТАРНУЮ ПАРУ С

- 1) аденином
- 2) ксантином
- 3) гуанином

4) гипоксантин

11. ПЕРВИЧНУЮ СТРУКТУРУ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ФОРМИРУЮТ СВЯЗИ

- 1) ионные
- 2) 3',5'-фосфодиэфирные
- 3) профосфатные
- 4) водородные
- 5) координационные

12. 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 ГИСТОНАМИ ВЕДЕТ К ОБРАЗОВАНИЮ

- 1) рибосомы
- 2) миозина
- 3) вируса
- 4) нуклеосомы

14. ДЕНАТУРАЦИЯ СТРУКТУРЫ ДНК ПРИВОДИТ К

- 1) изменению спектра поглощения
- 2) уменьшению вязкости
- 3) гиперхромному эффекту
- 4) увеличению плавучей плотности

РАЗДЕЛ 5. ВИДЫ ПЕРЕНОСА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ

ТЕМА 5.1. МАТРИЧНЫЕ БИОСИНТЕЗЫ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Актуальность

Перенос генетической информации является одним из основных свойств живой материи, лежащих в основе воспроизведения себе подобных. 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 транскрипта 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.

Цель

Ознакомление с методом ПЦР-диагностики.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Характеристика схемы реализации потока генетической информации в клетке. Роль нуклеиновых кислот в переносе генетической информации. Хранение, воспроизведение и передача наследственной информации. Механизмы индукции и репрессии на примере лактозного оперона, схема Жакоба и Моно. Роль ДНК в этих процессах. Репликация, ее биологическое значение, этапы репликации – инициация, элонгация, удаление праймеров, терминация. Повреждение и репарация ДНК. Биосинтез РНК (транскрипция), строение транскрипта ДНК – матрицы синтеза, биологическая роль, этапы транскрипции – инициация, элонгация, терминация. Посттранскрипционная модификация пре-м-РНК, роль интронов и экзонов. Сплайсинг и кэпирование, их биологическое значение.

Вопросы для самоконтроля

1. Основная догма молекулярной биологии. Схема переноса генетической информации.
2. Роль ДНК и мРНК в потоке реализации генетической информации в клетке.

3. Репликация, в течение какой фазы клеточного цикла он протекает, каким способом, компоненты ДНК-синтезирующей системы, характеристика этапов: инициации, элонгации, исключения праймеров, терминации.
4. Строение транскриптона, его значение, функциональные участки, особенности состава транскриптона у эукариотов и прокариотов.
5. Регуляция транскрипции у прокариотов, механизмы индукции и репрессии на примере лактозного оперона, схема Жакоба и Моно.
6. Транскрипция, компоненты РНК-синтезирующей системы, характеристика этапов: инициации, элонгации, терминации.
7. Процессинг первичных транскриптов (пре-мРНК), значение процесса кэпирования.
8. Какой процесс называется репарацией, факторы ее вызывающие.
9. Механизм действия противоопухолевых препаратов – антимаетаболитов (метотрексата, 5-фторурацила).
10. Механизм действия антибиотика – рифамицина, ингибитором какого процесса он является.
11. Механизм действия антибиотиков – номермицина, новобиоцина.
12. Практическое применение ДНК-технологий в фармации, значение метода ПЦР-диагностики в медицинской практике.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Доклад – презентация «ПЦР-диагностика», практическое значение.

ТЕМА 5.2. РЕГУЛЯЦИЯ И МАТРИЧНЫЙ БИОСИНТЕЗ БЕЛКА

Актуальность

Белки, как и другие компоненты клетки непрерывно обновляются, процессы их синтеза и распада находятся в состоянии динамического равновесия. 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-тРНК; стрептомицин, неомицин, конвалин ингибируют инициацию трансляции; тетрациклин и стрептомицин тормозят элонгацию, препятствуя связыванию аминоацил-тРНК с А-центром рибосомы. Пептидилтрансферазная реакция блокируется пуромицином 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 методов количественного определения белка в сыворотке крови.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Изучение биосинтеза белка (трансляции). Основные компоненты белоксинтезирующей системы. Биологический (генетический) код, его свойства, роль м-РНК в биосинтезе белка. Роль т-РНК в синтезе белков, её адапторную функцию. Образование аминоксил-т-РНК. Основные этапы белкового синтеза: инициация, элонгация, терминация. Посттрансляционная модификация полипептидной цепи, примеры. Регуляция биосинтеза белка. Схема Жакоба и Моно (индукция, репрессия). Лекарственные вещества как активаторы и ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот и белка. Лекарственные вещества – мутагены. Генная инженерия. Методы, применение ДНК-технологий в медицине и фармации. Механизмы действия противоопухолевых и антибактериальных препаратов.

Вопросы для самоконтроля

1. Регуляция биосинтеза белка, схема Жакоба и Моно, механизм индукции и репрессии на примере лактозного оперона.
2. Основные компоненты белоксинтезирующей системы.
3. Роль м-РНК в биосинтезе белков, свойства генетического кода.
4. Адапторная роль транспортной РНК в биосинтезе белков, роль специфичных аминоксил-т-РНК-синтетаз.
5. Строение и функциональный цикл рибосом, значение рибосомальной РНК.
6. Этап инициации синтеза белка, последовательность образования иницирующего комплекса.
7. Этап элонгации синтеза белка, последовательность образования полипептидной цепи на большой субъединице рибосомы, стадии: связывание, транспептидация, транслокация.
8. Терминация синтеза белка, факторы её обуславливающие.
9. Посттрансляционная модификация белков, значение шаперонов.
10. Лекарственные препараты – активаторы и ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот и белка.
11. Механизм действия противоопухолевых препаратов, привести примеры.
12. Механизм действия антибактериальных препаратов, привести примеры.
13. Примеры лекарственных препаратов, обладающих мутагенной активностью.
14. Основные стадии методов генной инженерии, их применение в медицине и фармации.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Лабораторная работа 1 Количественное определение белка микробиуретовым методом

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.

Оборудование

Микроколориметр МКМФ-02М.

Материал исследования

Сыворотка крови.

Проведение анализа

	ОПЫТ, мл	СТАНДАРТ, мл
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

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

$E_{\text{оп}}$ и $E_{\text{ст}}$ – оптическая плотность опытной и стандартной проб,

$C_{\text{ст}}$ – 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 КАРАТ-МТ (рис. 4). Данный прибор предназначен для непосредственного измерения показателя преломления луча видимого света, (например, при определении концентрации белка в моче и сыворотке крови, плотности мочи, анализе мозговой и суставной жидкостей, плотности субретинальной и других жидкостей глаза).

Рис. 4. Рефрактометр КАРАТ-МТ



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:

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 в сыворотке крови

Дети:	новорожденные	52–91 г/л
	до 3 лет	54–85 г/л
Взрослые		65–85 г/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.

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 – гипергидратацией. Гипопроотеинемия чаще всего связана с уменьшением фракции альбуминов крови.

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

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

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* лежат 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 самым 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 $CaCl_2$).

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.

Генно-инженерные 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 изобрёл в 1983 году Кэри Мюллис (американский учёный). Впоследствии он получил за это изобретение Нобелевскую премию. В настоящее время ПЦР-диагностика является, одним из самых точных и чувствительных методов диагностики инфекционных заболеваний. Метод ПЦР-диагностики дает возможность избирательно синтезировать *in vitro* (в пробирке) небольшие участки ДНК и получить за 3-4 ч несколько миллионов копий исследуемого фрагмента (амплификация ДНК). 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.

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.

Кроме простого увеличения числа копий ДНК (амплификации), ПЦР позволяет производить множество других манипуляций с генетическим материалом (введение мутаций, сращивание фрагментов ДНК), и широко используется в биологической и медицинской практике, например, для диагностики заболеваний (наследственных, инфекционных), для установления отцовства, для клонирования генов, введения мутаций, выделения новых генов.

ПЦР – метод молекулярной диагностики, ставший для ряда инфекций «золотым стандартом», проверен временем и тщательно апробирован клинически. Метод ПЦР позволяет определить наличие возбудителя заболевания, даже если в пробе присутствует всего несколько молекул ДНК возбудителя.

ПЦР позволяет диагностировать наличие долго растущих возбудителей, не прибегая к трудоёмким микробиологическим методам, что особенно актуально в гинекологии и урологии при диагностике урогенитальных инфекций, передающихся половым путем (ИППП).

Также этим методом проводят диагностику вирусных инфекций, таких как гепатиты, ВИЧ и др.

Чувствительность метода значительно превосходит таковую у иммунохимических и микробиологических методов, а принцип метода позволяет диагностировать наличие инфекций со значительной антигенной изменчивостью.

Специфичность ПЦР при использовании технологии PCR даже для всех вирусных, хламидийных, микоплазменных, уреоплазменных и большинства других бактериальных инфекций достигает 100 %. Метод ПЦР позволяет выявлять даже единичные клетки бактерий или вирусов. ПЦР-диагностика обнаруживает наличие возбудителей инфекционных заболеваний в тех случаях,

когда другими методами (иммунологическими, бактериологическими, микроскопическими) это сделать невозможно.

Особенно эффективен метод ПЦР для диагностики трудно культивируемых, некультивируемых и скрыто существующих форм микроорганизмов, с которыми часто приходится сталкиваться при латентных и хронических инфекциях, поскольку этот метод позволяет избежать сложностей, связанных с выращиванием таких микроорганизмов в лабораторных условиях.

Применение ПЦР-диагностики также очень эффективно в отношении возбудителей с высокой антигенной изменчивостью и внутриклеточных паразитов. Методом ПЦР возможно выявление возбудителей не только в клиническом материале, полученном от больного, но и в материале, получаемом из объектов внешней среды (вода, почва и т. д.).

Использование ПЦР-диагностики:

- в урологической и гинекологической практике для выявления хламидиоза, уреаплазмоза, гонореи, герпеса, гарднереллёза, микоплазменной инфекции, ВИЧ – вирусов папилломы человека;

- в пульмонологии – для дифференциальной диагностики вирусных и бактериальных пневмоний, туберкулёза;

- в гастроэнтерологии – для выявления хеликобактериоза;

- в клинике инфекционных заболеваний – в качестве экспресс-метода диагностики сальмонеллёза, дифтерии, вирусных гепатитов В, С и G;

- в гематологии – для выявления цитомегаловирусной инфекции, онковирусов.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. МОЛЕКУЛЫ тРНК

- 1) служат адапторами аминокислот к кодомам мРНК
- 2) осуществляют передачу генетической информации дочерним клеткам
- 3) являются структурными компонентами рибосом

2. МОЛЕКУЛЫ мРНК

- 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

- 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 МЕХАНИЗМУ ДЕЙСТВИЯ ЯВЛЯЮТСЯ

- 1) рифамицин
- 2) стрептомицин
- 3) тетрациклины
- 4) эритромицин

8. 3',5'-ФОСФОДИЭФИРНЫЕ СВЯЗИ В «ЛИДИРУЮЩЕЙ» ЦЕПИ ДНК ОБРАЗУЕТ ФЕРМЕНТ

- 1) ДНК-полимераза δ
- 2) ДНК-лигаза
- 3) ДНК-полимераза α
- 4) ДНК-хеликаза

9. ПО ХИМИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЕ ПРАЙМЕР ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) нуклеотидом
- 2) олигорибонуклеотидом
- 3) фрагментом цепи ДНК
- 4) дезоксибинуклеотидом

10. РАЗРЫВ 3',5'-ФОСФОДИЭФИРНЫХ СВЯЗЕЙ В ЦЕПИ ДНК ВЫПОЛНЯЕТ ФЕРМЕНТ

- 1) ДНК-хеликаза
- 2) ДНК-топоизомераза
- 3) ДНК-полимераза α

РАЗДЕЛ 6. ИММУНОБИОХИМИЯ

ТЕМА 6.1. БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ИММУНИТЕТА

Актуальность

Иммунная система локализована в кровеносных сосудах, в лимфе, в селезенке, а также в лимфоидных тканях. Разделяют клеточный и гуморальный иммунитет.

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 обладающие 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, их практическим применением.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Иммунная система организма. Принципы клеточного и гуморального иммунитета. Строение, классы иммуноглобулинов, их специфические функции в иммунном ответе организма. Реакция «антиген – антитело». Происхождение разнообразия антител (транспозиция генов и другие механизмы). Моноклональные антитела и методы их получения. Методы обнаружения и выделения антител. Индукция синтеза антител. Наследственность и вторичные дефекты иммунной системы.

Вопросы для самоконтроля

1. Значение иммунной системы, её центральные органы и периферические лимфоидные железы.
2. Образование и созревание Т-лимфоцитов, принципы клеточного иммунитета.
3. Образование и созревание В-лимфоцитов, принципы гуморального иммунитета.
4. Общий принцип строения антител.
5. Классификация иммуноглобулинов, их специфические функции в иммунном ответе организма.
6. Реакция «антиген – антитело», понятия «преципитация», «агглютинация».
7. Клонально-селекционная теория биосинтеза антител.
8. Неспецифические защитные реакции организма.
9. Роль наследственности и вторичные дефекты иммунной системы, ВИЧ-инфекция как пример иммунодефицита.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Лабораторная работа

Имуноферментный метод определения содержания пролактина

Принцип метода

Метод основан на твердофазном иммуноферментном анализе и заключается в специфическом связывании моноклональных антител к пролактину, адсорбированных на лунках иммунологического планшета, с последующим образованием конъюгата.

Материал исследования

Сыворотка крови

Реактивы

1) конъюгат моноклональных антител к пролактину с пероксидазой хрена, раствор для разведения сывороток, 2) фосфатно-солевой буферный раствор с твином, 3) раствор тетраметибензидаина, 4) стоп-реагент, 5) контрольный образец с известным содержанием пролактина, 6) калибровочные образцы, содержащие известные количества пролактина.

Оборудование

Прибор УНИПЛАН (АИФР-01) (рис. 5). предназначен для проведения всех видов иммунологических исследований при диагностике СПИД, гепатитов А, В и С, гриппа, герпеса простого, краснухи, кори, оспы, сифилиса, коклюша, дифтерии, пневмококковой инфекции, туберкулеза и т.д.; для определения различных классов иммуноглобулинов, гормонов, ферментов и других биологически активных веществ.

**Рис. 5. Прибор
УНИПЛАН (АИФР-01)**



Проведение анализа

1. *Внесение образцов.* Внести в дублях, начиная с верхних лунок первых двух стрипов по 100 мкл калибровочных образцов. В остальные лунки внести по 100 мкл контрольного образца и по 100 мкл анализируемых образцов сыворотки.
2. *Внесение конъюгата моноклональных антител.* Конъюгат готов к использованию. В лунки внести по 50 мкл конъюгата.
3. *Инкубация.* Стрипы заклеить пленкой и инкубировать при температуре 37 °С в течение 60 мин в термостатируемом шейкере с частотой 650 об/мин.
4. *Промывка.* По окончании инкубации снять липкую планку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть планшет 5 раз промывочным раствором, чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить не менее 350 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.
5. *Внесение тетраметилбензидина (ТМБ).* Раствор ТМБ готов к использованию. Внести во все лунки по 100 мкл ТМБ.
6. *Инкубация.* Стрипы заклеить пленкой и инкубировать в темноте при температуре 37 °С в течение 60 мин в термостатируемом шейкере с частотой 650 об/мин.
7. *Внесение стоп-реактива.* Внести во все лунки 100 мкл стоп-реактива. Встряхнуть планшет на шейкере в течение 10–15 с; при этом содержимое лунок окрашивается в желтый цвет.
8. *Измерение.* Измерить оптическую плотность на спектрофотометре, позволяющем проводить измерения оптической плотности в лунках планшета в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине сравнения в диапазоне 620–665 нм.

Нормальные показатели

мужчины 2,5–17 нг/мл (мкМЕ/л);

женщины – фолликулярная фаза 4,5-33 нг/мл (134-975 мкМЕ/л), лютеиновая фаза 4,9-40 нг/мл (104-848 мкМЕ/л).

Клинико-диагностическое значение

В норме повышение пролактина происходит во время сна, физической нагрузке, полового акта. Во время беременности гормон повышается с 8-й по 25-ю неделю и в период лактации. Перед родами происходит снижение пролактина.

Увеличение концентрации	Снижение концентрации
Пролактинома	Острая порфирия
Неврогенные и психиатрические нарушения, нарушения менструального цикла	Острые и хронические физические и психические стрессовые ситуации (депрессия, операция, болезненные месячные)
Акромегалия	Гипогликемия
Гирсутизм (гиперандрогения)	

Оформление работы

Указывают принцип метода, ход работы, нормальные величины и результаты исследования, отмечают клинико-диагностическое значение показателя и делают вывод о возможной патологии.

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.

Методы ИФА используются для определения антител при различных инфекционных заболеваниях (сифилисе, ВИЧ-инфекции, вирусных гепатитах),

уровня гормонов, аутоантител и различных маркеров онкологических заболеваний.

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 меченных 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 (ортофенилендиамин – 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 вносятся 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.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. ИММУНОГЛОБУЛИНЫ СИНТЕЗИРУЮТСЯ В КЛЕТКАХ
 - 1) В-лимфоцитах
 - 2) Т-лимфоцитах

2. ПО ХИМИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЕ ИММУНОГЛОБУЛИНЫ ЯВЛЯЮТСЯ
 - 1) простыми белками
 - 2) гликопротеинами
 - 3) полипептидами

3. ИММУНОГЛОБУЛИНЫ СПЕЦИФИЧЕСКИ ВЗАИМОДЕЙСТВУЮТ С
 - 1) антителами
 - 2) антигенами

4. МОНОМЕРОМ ПО ХИМИЧЕСКОМУ СТРОЕНИЮ ЯВЛЯЕТСЯ
 - 1) иммуноглобулин А
 - 2) иммуноглобулин G
 - 3) иммуноглобулин D
 - 4) иммуноглобулин E
 - 5) иммуноглобулин M

5. РАЗНООБРАЗИЕ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ОПРЕДЕЛЯЕТСЯ
 - 1) функцией
 - 2) молекулярной массой
 - 3) первичной структурой тяжелых цепей
 - 4) первичной структурой легких цепей

6. АКТИВНЫЙ ЦЕНТР АНТИТЕЛА ФОРМИРУЕТСЯ ЗА СЧЕТ
 - 1) тяжелой цепи
 - 2) взаимодействия переменных областей тяжелой и легкой цепей
 - 3) легкой цепи
 - 4) связывания антигена

7. КЛАСС ИММУНОГЛОБУЛИНА ОПРЕДЕЛЯЕТСЯ
 - 1) типом легкой цепи
 - 2) типом тяжелой цепи

8. ЗАЩИТНЫМИ БЕЛКАМИ ПЛАЗМЫ КРОВИ ЯВЛЯЮТСЯ
 - 1) иммуноглобулины E
 - 2) иммуноглобулины M
 - 3) иммуноглобулины A
 - 4) иммуноглобулины G

9. В СЕКРЕТАХ МОЛОКА И СЛЮНЕ ПРИСУТСТВУЮТ АНТИТЕЛА

- 1) класса G
- 2) класса E
- 3) класса A
- 4) класса Д
- 5) класса 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, CO_2 , 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, теofilлин и др. алкалоиды) и при физиологических значениях pH лишь слабо ионизированы. Ионизированные формы лекарственных веществ хорошо растворимы в воде и плохо – в липидах, 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.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Разнообразие мембран, их биологические функции. Принцип строения мембран. Химическое строение, свойства, функции мембранных липидов, особенности их расположения. Белки мембран, их классификация по расположению в мембране и функциям. Свойства мембран. Виды трансмембранного переноса веществ. Простая и облегченная диффузия. Активный транспорт. Эндо- и экзоцитоз. Липосомы как модельная система биомембран, их применение в фармации и медицине.

Вопросы для самоконтроля

1. Основные функции биологических мембран.
2. Разнообразие биологических мембран в клетке.
3. Структурная организация биологических мембран.
4. Строение и свойства мембранных липидов.
5. Белки мембран, их классификация по расположению в мембране и функциям.
6. Свойства мембран (замкнутость, избирательная проницаемость и др.).
7. Виды трансмембранного переноса.
8. Особенности везикулярного транспорта (эндо- и экзоцитоз).
9. Характеристика простой и облегченной диффузии, примеры веществ.
10. Характеристика активного транспорта веществ через мембраны, примеры.
11. Примеры механизмов передачи гормонального сигнала в клетку.
12. Липосомы как модельная система биомембран, примеры их применения в медицине.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Лабораторная работа 1

Количественное определение малонового диальдегида

Процесс ПОЛ активируется при хроническом стрессе, сопровождающемся болевым синдромом, тканевой гипоксии, повышении активности эндогенных фосфолипаз, липосомальных эндопептидаз, а также при гипербарической оксигенации вследствие образования активных форм кислорода (OH^* – гидроксильный радикал; O_2^- – супероксиданион; H_2O_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 CH_2 -групп, находящихся между 2-мя 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 (М_м=179). Внесение навески в пробу производят ех 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; 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 37⁰С 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:

$\varepsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ и выражают в мкмоль/мг белка в пробе.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один или несколько правильных ответов.

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 СТЕРОИДОВ 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 ТРАНСЛОКАЗАМИ В ОДНОМ НАПРАВЛЕНИИ НАЗЫВАЕТСЯ

- 1) симпортом
- 2) антипортом
- 3) унипортом

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 $\frac{1}{2} O_2$. Конечными продуктами тканевого дыхания являются вода окисления и диоксид углерода (H_2O и 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 семинара

Изучение общих представлений об обмене веществ и энергии: этапах биологического окисления; способах синтеза АТФ; процессах образования конечных продуктов тканевого дыхания.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Общее представление об обмене веществ. Пластическая и энергетическая функции обмена, значение анаболизма и катаболизма для клетки организма. Представление об обмене энергии, стадиях катаболических превращений питательных веществ в организме (и клетках), связанные с высвобождением свободной энергии. Формы трансформации свободной энергии – образование восстановительных эквивалентов (НАДФН) и синтез макроэргических соединений (АТФ, 1,3 -дифосфоглицерат, креатинфосфат, ацил-КоА, и др.). Взаимосвязь катаболизма и анаболизма. Схема: цикл АТФ-АДФ. АТФ – универсальный источник и переносчик химической энергии в клетке. Химическое строение и свойства молекулы АТФ.

Представление о тканевом дыхании (биологическом окислении) – общая схема. Специфические и неспецифические (общий путь катаболизма – ОПК). Локализация ферментов тканевого дыхания в клетке. Строение митохондрий. Общие законы термодинамики, свойственные биоэнергетики клетки. Основные процессы тканевого дыхания: химизм окислительного декарбоксилирования

пирувата, мультиферментный пируватдегидрогеназный комплекс, роль коферментов и витаминов; химизм цикла трикарбоновых кислот (цикл Кребса), роль универсального метаболита Ацетил-КоА, значение активных форм водорода НАД Н₂, ФАД Н₂. Кислород – конечный акцептор протонов и электронов, транспортируемых от дегидрированных субстратов биологического окисления. Строение цепи переноса электронов (дыхательной цепи) внутренней мембраны митохондрий. Молекулярная организация ферментных ансамблей, роль коферментов (ФМН, Fe-S-белки, коэнзим Q, гемовые группы цитохромов). Изменение свободной энергии в процессе переноса электронов, роль электрохимического потенциала в образовании АТФ. Трансмембранный перенос протонов и механизм окислительного фосфорилирования. Протонная АТФ-синтетаза. Коэффициент P/O. Разобщение дыхания и фосфорилирования. Функционирование дыхательной цепи: сопряжение окисления и фосфорилирования (хемиосмотическая теория Митчелла).

Применение нуклеотидов (АТФ, АДФ, АМФ, ФМН) в качестве лекарственных препаратов.

Вопросы для самоконтроля

1. Какие свойства живой материи обеспечивают взаимосвязь организма человека с окружающей средой.
2. Обмен веществ, характеристика этапов и их локализация.
3. Представление о катаболических и анаболических направлениях метаболизма в клетке, их значении.
4. Взаимосвязь обмена веществ с обменом энергии.
5. Что является первичным источником энергии на Земле?
6. В каком виде энергия поступает в организм человека и как она называется?
7. Как называется процесс продуцирования энергии в клетках организма, в какие конечные формы трансформируется «свободная энергия»?
8. Этапы катаболизма питательных веществ в организме (клетке).
9. Что называют циклом АТФ-АДФ? Способы синтеза фосфорилирования АТФ в клетке.
10. Биологическое окисления, характеристика этапов, их локализация.
11. Характеристика структуры митохондрий, локализация основных процессов биоэнергетики.
12. Окислительное декарбоксилирование пирувата, связь процесса с митохондриальной дыхательной цепью переноса электронов, энергетический выход.
13. Представление об общем пути катаболизма (ОПК), его значение в катаболизме веществ.
14. Цикл трикарбоновых кислот, роль первичных акцепторов водорода, взаимосвязь процесса с митохондриальной дыхательной цепью переноса электронов, энергетический выход.
15. Способы фосфорилирования (синтеза АТФ) в биологическом окислении, привести примеры реакций, сопряженных с синтезом АТФ.

16. Локализация и строение митохондриальной дыхательной цепи, особенности расположения ферментов, значение редокс-потенциала.
17. Функционирование митохондриальной дыхательной цепи, механизм сопряжения окисления и фосфорилирования (хемиосмотическая теория Митчелла).
18. Что называют дыхательным контролем?
19. Что называют коэффициентом P/O?
20. Какой процесс называется свободным окислением? Привести примеры разобщителей окисления и фосфорилирования.
21. Процессы образования CO_2 и H_2O – конечных продуктов тканевого дыхания.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. ЦИКЛ ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ ЛОКАЛИЗУЕТСЯ
 - 1) на внутренней мембране митохондрий
 - 2) в матриксе митохондрий
 - 3) в цитоплазме клетки
2. ОСНОВНАЯ ФУНКЦИЯ ЦИКЛА ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ ЗАКЛЮЧАЕТСЯ В
 - 1) образовании двух молекул CO_2
 - 2) выделении энергии моля ГТФ (АТФ)
 - 3) генерации водорода (образование 3НАДН и 1ФАДН₂)
3. К РЕАКЦИЯМ ДЕГИДРИРОВАНИЯ ОТНОСЯТСЯ ПРЕВРАЩЕНИЯ
 - 1) цитрата 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
4. КОЛИЧЕСТВО РЕАКЦИЙ ДЕГИДРИРОВАНИЯ В ЦИКЛЕ КРЕБСА
 - 1) три
 - 2) четыре
 - 3) пять
5. РАЗОБЩИТЕЛЕМ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ ЯВЛЯЕТСЯ
 - 1) малат
 - 2) 2,4-динитрофенол
 - 3) сукцинат
 - 4) цитрат

6. К СУБСТРАТАМ ОКИСЛЕНИЯ В ЦИКЛЕ КРЕБСА ОТНОСЯТ

- 1) оксалоацетат
- 2) сукцинат
- 3) малат
- 4) фумарат
- 5) изоцитрат
- 6) α -кетоглутарат

7. ПРИ ОКИСЛЕНИИ 1 МОЛЯ АЦЕТИЛ-КОА ДО CO_2 И H_2O ОБРАЗУЕТСЯ

- 1) 5 АТФ
- 2) 1 АТФ
- 3) 10 АТФ
- 4) 12 АТФ

8. 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 исследование влияния пищеварительных ферментов на полисахариды пищи.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Углеводы и их роль в организме. Классификация углеводов по структуре и функциям. Строение основных представителей углеводов: моно-, ди- и полисахаридов (рибозы, глюкозы, фруктозы, мальтозы, лактозы, галактозы, сахарозы, крахмала и гликогена). Представление о структуре гликозаминогликанов (мукополисахаридов): гиалуроновая, хондроитинсерная кислота, нейраминовая и сиаловая кислоты, гепарин. Углеводы пищи, переваривание и всасывание. Роль печени в обмене углеводов: взаимопревращение моносахаридов, химизм синтеза и распада гликогена. Гормональная регуляция обмена гликогена, роль ц-АМФ. Особенности обмена гликогена в печени и мышцах. Биохимические механизмы наследственной непереносимости углеводов (лактозная интолерантность, галактоземия). Наследственные нарушения обмена гликогена (гликогенозы). Уровень глюкозы в крови.

Вопросы для самоконтроля

1. Какой класс органических веществ называется «углеводами»? Классификация углеводов.
2. Структура основных представителей моно-, ди-, полисахаридов (рибоза, глюкоза, фруктоза, галактоза, мальтоза, лактоза, сахароза, крахмал, гликоген, целлюлоза), их биологическая роль.
3. Структура гликозаминогликанов (мукополисахаридов): гиалуроновая, хондроитинсерная, нейраминовая, сиаловая кислоты, гепарина, их биологическая роль.
4. Назвать углеводы, поступающие в организм человека с пищей, а также суточную потребность в углеводах.
5. Внешний обмен углеводов, ферменты, участвующие в переваривании углеводов, пути всасывания моносахаридов из кишечника в кровь.
6. Назвать роль целлюлозы в рационе питания человека.
7. Виды транспорта углеводов в клетки, роль переносчиков – ГЛЮТ.
8. Значение реакций фосфорилирования глюкозы в клетке, локализация глюкокиназы и гексокиназы.
9. Характеристика метаболизма углеводов в клетке, анаболические и катаболические пути.
10. Синтез гликогена и гормональная регуляция процесса депонирования.
11. Распад гликогена и его гормональная регуляция. Какой процесс называется мобилизацией гликогена?
12. Какой процесс называется мобилизацией гликогена? Особенности обмена гликогена в печени и мышцах.
13. Аденилатциклазный механизм регуляции активности ключевых ферментов обмена гликогена, роль цАМФ и влияние адреналина, глюкагона и инсулина на концентрацию цАМФ в клетке.
14. Наследственные нарушения переваривания углеводов и обмена гликогена (лактозная интолерантность, непереносимость сахарозы, гликогенозы и агликогенозы).

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Лабораторная работа

Исследование влияния пищеварительных ферментов на крахмал и целлюлозу

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

Фермент α -амилаза гидролизует только α -(1→4)-гликозидные связи.

Принцип

Ферменты пищеварительных соков, 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 CuSO_4 ; 5) 10 % раствор NaOH .

Проведение анализа

Готовят пробы соответственно таблице:

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

Затем для инкубации пробирки помещают в водяную баню при 37°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 NaOH и по 5 капель раствора 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, т.е. присутствие мальтозы – продукта гидролиза крахмала.

Оформление работы

Результаты оформляют в виде таблицы:

№ пробы	Субстрат	Источник фермента	Фермент	Результаты

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

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

Приобретение практических навыков количественного определения глюкозы в сыворотке крови глюкозооксидазным методом. Ознакомление с методами обнаружения молочной кислоты – продукта анаэробного гликолиза.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Метаболические пути внутриклеточного превращения глюкозы. Пути анаэробного катаболизма углеводов (глюкозы) в клетках: гликолиз, гликогенолиз, спиртовое брожение – последовательность реакций, балансовые уравнения, энергетический эффект, способ образования АТФ, локализация процессов. Биосинтез глюкозы (глюконеогенез): возможные предшественники, последовательность реакций, химизм «обходных» реакций. Глюкозо-лактатный цикл (цикл Кори). Физиологическое значение. Гормональная регуляция гликолиза и глюконеогенеза.

Вопросы для самоконтроля

1. Метаболические пути превращения глюкозы в анаэробных условиях.
2. Какой процесс называется гликолизом? Последовательность реакций, ферменты, локализация, энергетический эффект, суммарное уравнение.
3. Какие реакции гликолиза протекают с затратой АТФ и какие реакции, сопряжены с синтезом АТФ (способ фосфорилирования).
4. Значение цикла гликолитической оксиредукции. Какой метаболит гликолиза окисляется? Какой восстанавливается?
5. Какой процесс называется гликогенолизом? Последовательность реакций, ферменты, суммарное уравнение. Сравнить энергетический эффект процессов: гликогенолиза и гликолиза.
6. Метаболизм фруктозы и галактозы, биохимические основы фруктозурии и галактоземии.
7. Какой процесс называется глюконеогенезом? Назвать субстраты для синтеза глюкозы, последовательность реакций (прямых и «обходных»), ферменты, локализацию, суммарное уравнение, расход энергии для синтеза 1 молекулы глюкозы.
8. Что называют циклом Кори? Его значение при длительной физической работе.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Лабораторная работа 1

Обнаружение молочной кислоты в мышечной ткани (реакция 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); при 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, рН 7,2; 2) 1 % раствор фенола; 3) 1 % раствор $FeCl_3$.

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 $FeCl_3$ 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.

Лабораторная работа 2

Количественное определение

глюкозы глюкозооксидазным методом

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

Оборудование

Микроколориметр МКМФ-02М.

Проведение анализа

	ОПЫТ, мл	СТАНДАРТ, мл
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

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

$E_{\text{оп}}$ – 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 физиологическим гипергликемиям относятся:

- алиментарная, возникающая при одномоментном приеме больших количеств легкоусвояемых углеводов – моно- и дисахаридов;
- нейрогенная, возникающая 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 (феохромочитома), и коркового слоя надпочечников с усиленной продукцией глюкокортикоидов, гиперфункции щитовидной железы, а также с поражениями диэнцефальной области и при 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 β -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 снижением продукции гормонов – антагонистов инсулина. Нейрогенные гипогликемии наблюдаются при заболеваниях нервной системы (энцефалит, прогрессивный паралич и др) и при психических заболеваниях (хронический алкоголизм, циклотимия 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 обменов 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.

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 ознакомление с глюкозотолерантным тестом.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Метаболические пути превращения углеводов (глюкозы) в аэробных условиях, их биологическое значение. Эффект Пастера. Этапы аэробного распада глюкозы до конечных продуктов CO_2 и H_2O , выход АТФ. Этапы аэробного окисления глюкозы: аэробный гликолиз (до пирувата), окислительного декарбоксилирования пирувата, ОПК – общий путь катаболизма (цикл трикарбоновых кислот, работа дыхательной цепи). Роль глицерофосфатного и малатаспартатного челночных механизмов. Пентозофосфатный путь превращения глюкозы, химизм окислительной стадии процесса, представление о неокислительной стадии. Гормональная регуляция обмена углеводов. Роль гормонов: адреналина, глюкагона, глюкокортикоидов, инсулина. Нарушения обмена углеводов при сахарном диабете, причины развития гипергликемии и глюкозурии. Галактоземии. Гликогенозы и агликогенозы.

Вопросы для самоконтроля

1. Метаболические пути аэробного катаболизма глюкозы в клетке.
2. Аэробное окисление глюкозы до CO_2 и H_2O , назвать специфические и неспецифический (общий) этапы окисления, суммарное уравнение, энергетический эффект.

3. Роль глицеролфосфатного и малатаспартатного челночных механизмов при аэробном окислении глюкозы до CO_2 и H_2O , их локализация в тканях организма.
4. Особенности анаэробного и аэробного гликолиза. Что называют эффектом Пастера?
5. Особенности метаболизма глюкозы в мышцах при короткосрочной и длительной мышечной нагрузке.
6. Общий путь катаболизма (ОПК), назвать основные стадии и их значение.
7. Окислительное декарбоксилирование пирувата, локализация, строение полиферментного пируватдегидрогеназного комплекса.
8. Цикл трикарбоновых кислот, ферменты, их роль в генерации водорода, связь процесса с митохондриальной дыхательной цепью.
9. Строение и функционирование митохондриальной дыхательной цепи, механизм сопряжения процессов окисления и фосфорилирования (теория Митчелла).
10. Пентозофосфатный путь окисления глюкозы: окислительная и неокислительная стадии, распространение и биологическая роль, взаимосвязь процесса с гликолизом.
11. Гормональная регуляция уровня глюкозы в крови, возможные причины «гипо»- и «гипергликемии».
12. Гормональная регуляция процессов углеводного метаболизма в абсорбтивный, постабсорбтивный периоды и голодании.
13. Какие биохимическими признаками характеризуют нарушения обмена углеводов при сахарном диабете, объяснить причины их возникновения.
14. Диагностическое значение теста на глюкозотолерантность и характеристика гликемических кривых.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Лабораторная работа

Влияние сахарной нагрузки на содержание глюкозы в крови (глюкозотолерантный 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 тестом 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.

Оборудование

Микроколориметр МКМФ-02М.

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:

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

$E_{\text{оп}}$ – оптическая плотность пробы, $E_{\text{ст}}$ – оптическая плотность стандарта, $C_{\text{ст}}$ – 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

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

$C_{\text{МАКС}}$ и $C_{\text{ИСХ}}$ – соответственно максимальная и исходная концентрации глюкозы в крови во время теста.

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

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

Практическое значение

Выделяют несколько видов гликемических кривых.

Параметр	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 (рис. 6):

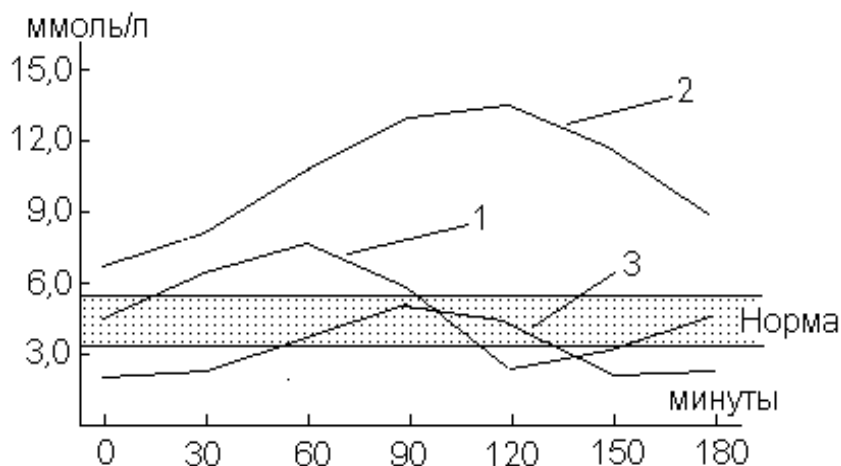


Рис. 6. Типы гликемических кривых: нормальная (1), гипергликемическая (2), гипогликемическая (3)

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

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. ОСНОВНОЙ ПРОЦЕСС ПЕРЕВАРИВАНИЯ УГЛЕВОДОВ ПРОИСХОДИТ В

- 1) ротовой полости
- 2) желудке
- 3) тонком кишечнике

2. 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_2
- 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 ФИЗИЧЕСКОЙ РАБОТЕ В МЫШЦАХ АКТИВИРУЕТСЯ

- 1) спиртовое брожение
- 2) глюконеогенез
- 3) гликолиз
- 4) гликогенолиз

9. ПУТЕМ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ АКТИВИРУЕТСЯ ФЕРМЕНТ

- 1) аденилатциклаза
- 2) гликогенсинтаза
- 3) гликогенфосфоорилаза

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) α -1,6-глюкозидаза
- 2) гликогенфосфорилаза
- 3) гликогенсинтаза

12. ОСНОВНОЕ НАЗНАЧЕНИЕ ПЕНТОЗОФОСФАТНОГО ПУТИ ЗАКЛЮЧАЕТСЯ В

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

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

Задача № 1

Студент готовился к экзамену и съел сразу 200 г сахара. Можно ли ожидать появление глюкозурии?

Объяснить, как изменится уровень глюкозы, назвать причины глюкозурии.

Задача № 2

Через 30 мин после приёма 100 г сахара содержание глюкозы в крови у пациента повысилось в 1,5 раза, а после употребления 100 г хлеба оно существенно не изменилось.

Объяснить причину.

Задача № 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, что у ребенка диабет?

Задача № 4

Больному со склонностью к полноте рекомендовано ограничить употребление углеводов и заниматься физкультурой.

Объяснить причину.

Задача № 5

Спортсмен пробежал стометровую дистанцию.

Какие изменения произойдут в составе крови?

Задача № 6

Один спортсмен пробежал на соревнованиях дистанцию 100 м, другой – 5000 метров.

Объяснить особенности метаболизма углеводов у спортсменов, изменения уровня лактата в крови.

Задача № 7

Выполняя рекомендации врача, пациент двое суток не получал углеводов, однако значительного снижения уровня глюкозы в крови не наблюдалось.

Объяснить какие механизмы стабилизируют уровень сахара в крови?

Задача № 8

При обследовании у пациента в крови обнаружено 9,5 ммоль/л.

Объяснить причины гипергликемии? Какие анализы целесообразно проводить для уточнения ее характера?

Задача № 9

У пациента содержание глюкозы в крови 4,1 ммоль/л, в суточной моче 1% глюкозы.

Объяснить причины глюкозурии?

Задача № 10

Пациенту подкожно ввели раствор инсулина.

Объяснить, как изменится содержание глюкозы в крови? Почему?

Задача № 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?

Задача № 12

В больницу поступил ребенок, у которого после употребления молока началась рвота.

Объяснить причину.

Задача № 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.

Объяснить, 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, не растворимые 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 и обнаружения компонентов фосфатидилхолина в яичном желтке.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Классификация жирных кислот и многокомпонентных липидов. Характеристика структуры, физико-химические свойства и биологическая роль основных классов липидов, их локализация в организме. Химическое строение и тривиальные названия простых и смешанных триацилглицеролов, фосфолипидов (фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина), стероидов (холестерина и эфиров холестерина). Представление о химической структуре гликолипидов, инозитфосфолипидов. Высшие жирные кислоты – структурный компонент омыляемых липидов. Классификация. Физико-химические свойства жирных кислот (знать формулы масляной, пальмитиновой, стеариновой, линолевой, линоленовой, арахидоновой жирных кислот). Производные жирных кислот (простагландины, лейкотриены и др.), их значение. Внешний обмен липидов. Суточная потребность в пищевых липидах. Переваривание, всасывание продуктов переваривания липидов. Роль ферментов и желчных кислот. Формулы желчных кислот: холевой, дезоксихолевой, хенодезоксихолевой; парных желчных кислот (гликохолевая, таурохолевая). Ресинтез липидов в стенке кишечника. Роль хиломикрон в обмене липидов, принцип их строения. Биологическая норма содержания триацилглицеролов в крови. Нарушение переваривания и всасывания жиров (стеаторея, гиповитаминозы).

Вопросы для самоконтроля

1. Какой класс органических веществ называется липидами?
2. Классификация жирных кислот, пищевые источники жирных кислот.

3. Какие жирные кислоты относятся к семейству ω -3 и ω -6? Их биологическая роль.
4. Какую группу веществ называют эйкозаноидами? Их синтетический предшественник, направления метаболизма, разнообразие, биологическая роль.
5. Объяснить противовоспалительный эффект аспирина и глюкокортикоидов.
6. Строение, физико-химические свойства и биологическая роль триацилглицеролов, примеры простых и смешанных ТАГов. От чего зависит консистенция нейтрального жира?
7. Структурная основа всех глицерофосфолипидов, примеры представителей этой группы, их физико-химические свойства и биологическая роль.
8. Структурная основа сфингофосфолипидов, примеры представителей этой группы, их физико-химические свойства и биологическая роль.
9. Стероиды, их структурная основа, примеры представителей, физико-химические свойства и биологическая роль.
10. Строение цереброзидов и ганглиозидов, их физико-химические свойства и биологическая роль.
11. Конъюгированные желчные кислоты, их физико-химические свойства и биологическая роль.
12. Внешний обмен липидов, роль ферментов и желчных кислот, объяснить физиологическое значение ферментативного гидролиза экзогенных липидов в просвете тонкого кишечника.
13. Какой процесс называют ресинтезом? Его физиологическое значение и локализация.
14. Как называется транспортная форма экзогенных липидов? Указать принцип строения, место образования, транспорт.
15. Нарушения внешнего обмена, причины и последствия (гиповитаминозы, стеаторея).
16. Производные липидов, используемые в качестве лекарственных форм, содержащие ненасыщенные жирные кислоты, эйкозаноиды, фосфолипиды и др.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Лабораторная работа 1

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

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

Проведение анализа

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

Расчет

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

a – количество раствора щелочи, израсходованное на титрование; 0,00561 – титр 0,1 н раствора КОН; *b* – 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.

Лабораторная работа 2

Обнаружение фосфатидилхолина (лецитина)

в яичном желтке

Принцип

Метод основан на гидролизе лецитинов желтка в растворе NaOH и последующему определению 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 HNO₃, 4) молибденовый реактив, 5) 1 % раствор CuSO₄.

Проведение анализа

- *Гидролиз лецитина*: кусочек желтка помещают в пробирку и прибавляют 1–2 мл 10 % раствора NaOH, кипятят в водяной бане 15 мин.

- *Открытие холина*: холин при нагревании в щелочной среде превращается в триметиламин $N(CH_3)_3$, 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 кислот*: 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 $CuSO_4$, перемешивают, образуется хелатное соединение меди с глицерином ярко-синего цвета.

Оформление работы

Записывают результат реакций в виде таблицы:

Продукты гидролиза лецитина	Качественная реакция	Принцип реакции	окраска

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

Приобретение навыков определения уровня общих липидов и триацилглицеринов в сыворотке крови.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Основные пути внутриклеточного метаболизма простых липидов. Липолиз, его гормональная регуляция, роль аденилатциклазной системы. Окисление жирных кислот до конечных продуктов CO_2 и H_2O , энергетический выход при β -окислении, связь с ЦТК и дыхательной цепью (ОПК – общим путем катаболизма). Механизмы аэробного и анаэробного окисления глицерина, энергетический выход процессов. Липогенез, его гормональная

регуляция. Биосинтез нейтральных жиров. Источники глицерина и жирных кислот. Локализация путей липогенеза. Путь синтеза ТАГов из глюкозы (образование жирных кислот и глицерина из глюкозы, синтез триацилглицеролов). Биосинтез высших жирных кислот. Локализация процесса. Липопротеины крови и их роль в обмене триацилглицеролов (ТАГ). Дислипотеинемии. Синтез и использование кетоновых тел. Локализация и роль процессов.

Вопросы для самоконтроля

1. Назвать основные направления внутриклеточного метаболизма триацилглицеринов, гормональную регуляцию.
2. Какой процесс называется тканевым липолизом? Назвать роль гормончувствительной липазы и аденилатциклазной системы в регуляции ее активности.
3. Назвать пути энергетического и синтетического использования глицерина в клетках.
4. Какой процесс называется β -окислением? Назвать этапы окисления (специфические и неспецифический), указать связь с дыхательной цепью, энергетический выход процесса.
5. Назвать возможные пути образования и использования ацетил-S-КоА.
6. Объяснить причины кетоза при голодании и сахарном диабете.
7. Какой процесс называется липогенезом? Назвать пути эндогенного синтеза ТАГ, особенности биосинтеза жиров в жировой ткани и печени.
8. Синтез ТАГ из глюкозы: синтез жирных кислот и глицерина из глюкозы; образование фосфатидной кислоты из жирных кислот и глицерина.
9. Гормональная регуляция синтеза ТАГов, зависимость от ритма питания.
10. Транспорт ТАГов, строение и роль липопротеинов очень низкой плотности.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Лабораторная работа 1

Количественное определение триацилглицеринов в сыворотке крови

Принцип

Метод основан на использовании сопряженных ферментативных реакций, катализируемых:

1) *липазой*, катализирующей гидролиз триацилглицеринов до глицерола и жирных кислот; 2) *глицеролкиназой*, катализирующей фосфорилирование глицерола; 3) *глицеролфосфатоксидазой*, окисляющей глицерол-3-фосфат в присутствии O_2 до диоксиацетонфосфата с образованием H_2O_2 ; 4) *пероксидазой*, катализирующей в присутствии хлорфенола окисление перекисью водорода 4-аминоантипирин с образованием хинонимина, окрашенного продукта розово-малинового цвета, интенсивность окраски которого определяют колориметрически.

Реактивы

1) рабочий реактив: раствор липазы, глицеролкиназы, глицеролфосфатоксидазы, пероксидазы, хлорфенола, 4-аминоантипирин в

буферном растворе. 2) калибровочный раствор триацилглицеринов (калибратор), 2,29 ммоль/л.

Материал исследования

Сыворотка крови.

Оборудование

Микроколориметр МКМФ-02М.

Проведение анализа

	Опыт, мл	Контроль, мл
Рабочий реактив	3,00	3,00
Сыворотка	0,03	–
Калибратор	–	0,03
	Инкубируют не менее 15 мин при 20–25 ⁰ С. Измеряют оптическую плотность опытной и контрольной пробы при 500 нм. Окраска стабильна не менее часа после инкубации.	

Расчет

$$[\text{ТАГ, ммоль/л}] = (E_{\text{оп}}/E_{\text{ст}}) \times 2,29$$

Нормальные величины

Сыворотка 0,15–1,71 ммоль/л

Оформление работы

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

Лабораторная работа 2

Количественное определение

общих липидов 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 H₂SO₄. 2) фосфорно-ванилиновая смесь: концентрированную H₃PO₄ смешивают с 0,6 % раствором ванилина в соотношении 4:1. 3. Стандартный раствор: 0,6 % раствор триолеина.

Проведение анализа

	ОПЫТ, мл	СТАНДАРТ, мл	КОНТРОЛЬ, мл
Сыворотка крови	0,05	–	–
Стандартный р-р липидов	–	0,05	–
Дистиллированная 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		
Фосфорно-ванилиновая 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

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

$E_{\text{оп}}$ – 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, 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 нарушается 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

Освоение методов определения в сыворотке крови общего холестерина.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Биологическое значение и синтез фосфолипидов в печени: фосфатидилсерина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилхолина (последовательность реакций, коферменты, источники энергии). Роль липотропных веществ. Роль фосфолипидов в синтезе липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) – транспортной формы эндогенного жира. Причины жирового перерождения печени. Распад фосфолипидов, его значение для клетки. Биологическое значение и биосинтез холестерина (последовательность реакций до стадии образования мевалоновой кислоты, представление о дальнейших этапах). Гормональная регуляция синтеза холестерина. Роль транспортных липопротеинов в обмене холестерина. Схемы транспорта экзогенного и эндогенного холестерина. Роль ЛПВП, «обратный транспорт холестерина». Нарушения липидтранспортной функции. Дислипидопроteinемии и атеросклероз. Гиполипидемические лекарственные средства.

Вопросы для самоконтроля

1. Назвать биологическую роль фосфолипидов.
2. Катаболизм фосфолипидов в клетках, назвать ферменты и продукты гидролиза, их использование в клетках.
3. Назвать роль фосфатидной кислоты в метаболизме липидов.
4. Биосинтез фосфолипидов в печени, последовательность реакций, роль липотропных факторов.
5. Причины жирового перерождения печени, фармакологическая коррекция жирового гепатоза, диета.
6. Назвать биологическую роль холестерина.
7. Синтез холестерина в печени, последовательность реакций, форма транспорта из печени.
8. Классификация транспортных липопротеинов крови, особенности их состава, происхождение и биологическая роль.
9. Особенности транспорта экзогенного и эндогенного холестерина в организме. Какие клетки организма являются основными поглотителями холестерина?
10. Что называют «обратным транспортом» холестерина, чем завершается обмен холестерина? В каком виде он выводится из организма?
11. Нарушения обмена холестерина (гиперлипидопroteinемия, атеросклероз, желчекаменная болезнь), их фармакологическая коррекция.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Лабораторная работа Определение общего холестерина в сыворотке крови ферментативным методом

Принцип

Метод основан на использовании сопряженных ферментативных реакций, катализируемых ферментами: 1) *холестеролэстеразой*, осуществляющей гидролиз эфиров холестерина до свободной формы; 2) *холестеролоксидазой*, превращающей холестерин в холестенон с образованием H_2O_2 ; 3) *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.

Оборудование

Микроколориметр МКМФ-02М.

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 IIa и IIb, IV типов, нефротическом синдроме, диабете. Гипохолестеринемия – при гипопротеинемии, 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.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. ЛИНОЛЕВАЯ И ЛИНОЛЕНОВАЯ КИСЛОТЫ ВХОДЯТ В СОСТАВ ТРИАЦИЛГЛИЦЕРИНОВ

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

2. ПО ХИМИЧЕСКОМУ СТРОЕНИЮ ФОСФОЛИПИДАМИ ЯВЛЯЮТСЯ

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

3. ПО ХИМИЧЕСКОМУ СТРОЕНИЮ СТЕРОИДАМИ ЯВЛЯЮТСЯ

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

4. СТЕРОИДНУЮ ПРИРОДУ СТРОЕНИЯ ИМЕЕТ ВИТАМИН

- 1) С
- 2) К
- 3) А
- 4) Е
- 5) Д

5. ПО СТРУКТУРЕ ПРОСТАГЛАНДИНЫ ЯВЛЯЮТСЯ ПРОИЗВОДНЫМИ

- 1) циклопентанпергидрофенантрена
- 2) трехатомного спирта глицерина
- 3) полиненасыщенной жирной кислоты

6. ФОСФОЛИПИДЫ ГИДРОЛИЗУЮТСЯ ПОД ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТА

- 1) фосфолипазы
- 2) ацетилхолинэстеразы
- 3) неспецифической эстеразы
- 4) липазы

7. ПРИЧИНОЙ НАРУШЕНИЯ ПЕРЕВАРИВАНИЯ ЖИРОВ ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) нарушение синтеза панкреатической липазы
- 2) отсутствие секреции трипсина
- 3) нарушение поступления желчи в кишечник
- 4) затруднение поступления панкреатического сока в кишечник

8. ЭМУЛЬГАТОРАМИ ЖИРОВ В ОРГАНИЗМЕ ЧЕЛОВЕКА ЯВЛЯЮТСЯ

- 1) желчные кислоты
- 2) моноацилглицеролы
- 3) холин
- 4) креатин

9. ТРАНСПОРТ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В МИТОХОНДРИЮ ОСУЩЕСТВЛЯЕТ

- 1) карнозин
- 2) карнитин
- 3) креатинин
- 4) анзерин

10. ПРИ В-ОКИСЛЕНИИ СТЕАРИНОВОЙ КИСЛОТЫ ОБРАЗУЕТСЯ
АЦЕТИЛ-КОА В КОЛИЧЕСТВЕ

- 1) 8 молекул
- 2) 3 молекул
- 3) 9 молекул
- 4) 10 молекул
- 5) 7 молекул

11. АЦЕТИЛ-КОА В МИТОХОНДРИЯХ ОБРАЗУЕТСЯ В РЕЗУЛЬТАТЕ
ПРОЦЕССОВ

- 1) окислительное декарбоксилирование пирувата
- 2) β -окисление ЖК
- 3) ацетил-КоА-карбоксилазная реакция

12. ИСТОЧНИКОМ ВОДОРОДА В СИНТЕЗЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ
ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) НАДН₂
- 2) НАДФН₂
- 3) ФАДН₂
- 4) аскорбиновая кислота

13. АЦЕТИЛ-КОА ЯВЛЯЕТСЯ СУБСТРАТОМ ДЛЯ СИНТЕЗА

- 1) глицерола
- 2) жирных кислот
- 3) стероидов
- 4) кетоновых тел
- 5) инозита

14. МЕСТОМ ОБРАЗОВАНИЯ ЛПОНП ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) кишечник
- 2) кровь
- 3) печень

15. ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ГОЛОДАНИИ АКТИВИРУЮТСЯ ПРОЦЕССЫ

- 1) липолиз в жировой ткани
- 2) β -окисление в печени
- 3) синтез кетоновых тел в печени
- 4) липогенез в жировой ткани

16. АНТИАТЕРОГЕННОЙ АКТИВНОСТЬЮ ОБЛАДАЮТ

- 1) ХМ
- 2) ЛПНП
- 3) ЛПОНП
- 4) ЛПВП

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

Задача № 1

В результате длительного хранения сливочного масла изменился цвет, запах и вкус его ухудшился.

Объяснить, какие процессы обуславливают изменения качества масла. Какими количественными методами анализа можно оценить качество жира?

Задача № 2

У грудного ребенка в желудочном соке обнаружена высокоактивная липаза, тогда как у взрослого пациента ее активность не выявлена.

Объяснить причину. Являются ли эти данные патологическими (отклоняющимися от нормы)?

Задача № 3

У больного при зондировании двенадцатиперстной кишки установлена задержка оттока желчи из желчного пузыря.

Объяснить, влияет ли задержка оттока желчи на переваривание жиров?

Задача № 4

У больного обнаружено большое количество жира в кале (стеаторея).
Объяснить причины нарушения переваривания и всасывания жира.

Задача № 5

Через 5 часов после обеда провели исследование крови. Обнаружили повышение содержания липидов.

Объяснить причину.

Задача № 6

У пациента установлена недостаточность активности липопротеинлипазы, гидролизующей триацилглицерина хиломикрон на поверхности эпителия капилляров жировой ткани.

Назвать тип дислипотеинемии и причину ее возникновения.

Задача № 7

Человека укусила змея. При анализе крови обнаружен гемолиз эритроцитов.

Объяснить причину гемолиза.

Задача № 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.

Объяснить причину изменений.

Задача № 9

У больного с мочой выделяются кетоновые тела.

Как называется это патологическое состояние? Объяснить причины образования кетоновых тел.

Задача № 10

Больной сахарным диабетом внезапно потерял сознание.

Объяснить, может ли врач установить характер диабетической комы без лабораторного подтверждения.

Задача № 11

У больного обнаружена жировая дистрофия печени.

Какую диету следует рекомендовать?

Задача № 12

Пациенту с избыточным весом в результате ожирения врач рекомендовал диету с малым количеством углеводов.

Объяснить причину. Почему?

Задача № 13

Больной атеросклерозом поступил в клинику для обследования.

Объяснить, какие показатели липидного обмена следует анализировать лабораторными методами.

Задача № 14

Больному атеросклерозом врач при выписке из больницы рекомендовал сбалансировать диету, увеличить количество овощей.

Объяснить причину.

Задача № 15

У пациента в крови выявлено увеличение липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) при нормальном содержании липопротеинов низкой плотности (ЛПНП).

Назвать тип гиперлиппротеинемии, возможные клинические проявления.

РАЗДЕЛ 11. ОБМЕН БЕЛКОВ

ТЕМА 11.1. ВНЕШНИЙ ОБМЕН ПРОСТЫХ БЕЛКОВ

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.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Роль белков в организме, суточная потребность, частичная взаимозаменяемость при питании. Критерии полноценности пищевых белков. Незаменимые аминокислоты. Азотистый баланс, его виды. Нормы белка в питании. Переваривание белков в желудочно-кишечном тракте. Синтез соляной кислоты в желудке, ее роль. Виды кислотности желудочного сока, биологические нормы. Протеолитические ферменты и их характеристика: проферменты, активация, специфичность действия. Протеиназы – пепсин, трипсин, химотрипсин и другие; проферменты протеиназ и механизмы их превращения в ферменты; субстратная специфичность протеиназ. Экзопептидазы: карбоксипептидаза, аминопептидазы, дипептидазы.

Гниение белков в кишечнике, примеры реакций. Обезвреживание продуктов гниения, примеры реакций. Роль ферментов глюкуронил- и сульфотрансфераз. Химическое строение ФАФС и УДФГК.

Вопросы для самоконтроля

1. Назвать биологическую роль белков в организме.
2. Что называют «азотистым балансом»? Какие виды дисбаланса существуют, чем они обусловлены?
3. Нормы белка в питании, критерии биологической ценности белков.
4. Причины белковой недостаточности и её проявления («квашиноркор» и др.).
5. Переваривание белков в желудке, механизм синтеза соляной кислоты, ее биологические функции.
6. Назвать причины нарушения переваривания белков в желудке.

7. Переваривание белков в кишечнике, место образования и механизмы активации ферментов (протеиназ).
8. Физиологический смысл выработки протеолитических ферментов в неактивном состоянии, способ активации.
9. Назвать механизмы транспорта аминокислот в клетки.
10. Какой процесс называется гниением белков? Примеры превращений аминокислот.
11. Процесс обезвреживания токсичных продуктов, строение ферментов, осуществляющих конъюгацию, примеры реакций обезвреживания.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

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

Реактивы

Индикатор метилоранж.

Материал исследования

Нормальный и патологический желудочный сок.

Проведение анализа

В 2 пробирки вносят по 10 капель исследуемого желудочного сока, добавляют по 2 капли метилоранжа

Оформление работы

Отмечают принцип методов, регистрируют результаты в таблице.

Образец желудочного сока	Изменение окраски индикатора		Величина рН, вывод
	Конго красный	Метилоранж	
1			
2			
3			

Практическое значение

Желудочный сок, представляющий собой бесцветную жидкость с рН 1,5-1,8, вырабатывается в количестве 2–3 л 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. Так, повышенная кислотность – *гиперхлоргидрия* (увеличение содержания свободной НСІ и общей кислотности) имеет место при гиперацидном гастрите и часто сопровождается язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки. *Гипохлоргидрия* (пониженная кислотность) встречается при гипоацидном гастрите, в результате снижения бактерицидного действия соляной кислоты, активируются процессы гниения белков. *Ахлоргидрия* (полное отсутствие соляной кислоты и значительное снижение общей кислотности) отмечается при атрофическом гастрите, пернициозной анемии, карциноме желудка. *Ахилия* (отсутствие соляной кислоты и пепсина) связана со злокачественными новообразованиями желудка, пернициозной анемией.

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 хлористо-водородной кислотой; кислота хлористо-водородная (разведенная); ацидин-пепсин (бетацит, аципепсол, пепсамин); пепсидил (продукт гидролиза слизистой оболочки желудка с ферментами желудочного сока, растворенными в хлористо-водородной 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.).

Препараты угнетающие секрецию желудочного сока и нейтрализующие повышенную кислотность. К ним относят: магния 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 местно-анестезирующего 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 2

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.

Образец желудочного сока	Окраска	Вывод
1		
2		

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 3 **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	≥ 300	≥ 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 4 **Беззондовый метод определения кислотности** **желудочного сока (ацидотест)**

Принцип

Введенный в желудок *рег ос* краситель (2,4-диамино-4-этоксiazобензол) 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 соляно-кислая 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-этоксiazобензола, 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), стимулирующий 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 ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА АМИНОКИСЛОТ

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 видов 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.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Основные пути катаболизма аминокислот в клетках организма. Трансаминирование, строение трансаминаз и механизм их действия – «пинг-понг». Частные примеры трансаминирования при участии аланин- и аспаратаминотрансфераз (АлАТ и АсАТ), строение, клиническое значение определения их активности в сыворотке крови. Прямое окислительное дезаминирование глутаминовой кислоты, строение и роль глутаматдегидрогеназы. Непрямое дезаминирование, последовательность реакций, ферменты, биологическое значение. Специфические пути дезаминирования: серина, треонина, гистидина. Включение безазотистых остатков аминокислот в энергетический обмен. Гликогенные и кетогенные аминокислоты. Декарбоксилирование аминокислот, строение ферментов. Образование биогенных аминов (химизм): серотонина, гистамина, ГАМК. Роль биогенных аминов и их инактивация.

Вопросы для самоконтроля

1. Назвать основные пути пополнения аминокислотного фонда в клетках.
2. Системы транспорта аминокислот через клеточные мембраны.
3. Основные пути катаболизма аминокислот в клетке.
4. Какой процесс называется трансаминированием? Строение аминотрансфераз, механизм их действия.
5. Клинико-диагностическое значение определения АЛАТ и АСАТ в сыворотке крови.
6. Какой процесс называется дезаминированием аминокислот? Назвать его виды и значение для клетки.
7. Окислительное дезаминирование глутаминовой кислоты, значение и строение фермента глутаматдегидрогеназы.

8. Непрямое дезаминирование аминокислот, его значение в метаболизме.
9. Пути использования безазотистых остатков аминокислот в энергетическом обмене клетки, привести примеры, указать энергетический выход.
10. Какие аминокислоты называют гликогенными и кетогенными?
11. Какой процесс называют декарбоксилированием аминокислот? Строение ферментов, привести примеры реакций, назвать биологическое значение продуктов.
12. Инактивация биогенных аминов, значение процесса, указать аминоксидазы и их строение. Назвать фармакопрепараты – ингибиторы аминоксидаз, их применение.
13. Образование и роль гистамина в развитии аллергических реакций и воспаления, привести примеры антигистаминных препаратов.
14. Назвать примеры анаболических процессов в метаболизме аминокислот.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Лабораторная работа

Определение активности аминотрансфераз сыворотки крови

Трансаминирование – обратимый перенос α -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 α -кетоглутаровой кислоты и аспарагиновой кислоты, 4) раствор субстрата АлАТ: смесь α -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.

Оборудование

Микроколориметр МКМФ-02М.

Проведение анализа

	1-я проба, стандартная, мл	2-я проба, опытная для АлАТ, мл	3-я проба, опытная для АсАТ, мл
Субстратный раствор АлАТ	0,25	0,25	–
Субстратный раствор АсАТ	–	–	0,25
Эталонный раствор	0,05		–
Сыворотка	–	0,05	0,05
	Инкубируют 60 мин 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

$$[\text{Активность АлАТ, ммоль/л}\cdot\text{час}] = \frac{E_{\text{оп}2}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}}$$

$$[\text{Активность АсАТ, ммоль/л}\cdot\text{час}] = \frac{E_{\text{оп}3}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}}, \text{ где}$$

$E_{\text{ст}}$, $E_{\text{оп}2}$, $E_{\text{оп}3}$ – 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 используется 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 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.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Источники аммиака в клетках. Механизмы токсического действия аммиака. Содержание и формы транспорта аммиака в крови. Транспорт азота и мышц, схема глюкозо-аланинового цикла. Пути связывания (обезвреживания) аммиака. Химизм синтеза амидов, значение и локализация процесса. Роль глутамина в обезвреживании и транспорте аммиака. Химизм биосинтеза мочевины (орнитинового цикла). Связь орнитинового цикла с превращениями фумаровой и аспарагиновой кислот: происхождение атомов азота мочевины. Нарушения синтеза и выведения мочевины. Гипераммониемии. Аммониегенез (образование и выведение солей аммония), локализация и роль. Химизм синтеза креатина, креатинфосфата, креатинина и их роль в организме. Нормальные величины содержания форм связывания аммиака в крови и моче, диагностическое значение их определения.

Вопросы для самоконтроля

1. Назвать основные метаболические пути образования аммиака.
2. Характеристика механизма токсического действия аммиака.
3. Причины развития гипераммониемии, норма содержания и транспортные формы аммиака в крови.
4. Назвать метаболические пути связывания аммиака, их локализацию в организме.
5. Синтез амидов, его локализация, транспортной формы аммиака.
6. Орнитиновый цикл мочевинообразования, его локализация и биологическое значение.
7. Процесс образования креатина и креатинина, его значение и локализация.
8. Какой процесс называется восстановительным аминированием?
9. Какой процесс называется аммониегенезом? Назвать его локализацию, указать схему процесса.
10. Клинико-диагностическое значение определения мочевины, креатинина в сыворотке крови и моче.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Лабораторная работа 1

Количественное определения содержания мочевины в сыворотке крови и моче

Принцип

Мочевина под действием уреазы разлагается на углекислый газ и аммиак, который в реакциях с салицилатом и гипохлоридом натрия в присутствии натрия нитропруссидом образует окрашенный в зеленый цвет продукт. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию мочевины.

Реактивы

1) рабочий реактив: раствор уреазы, натрия салицилата и натрия нитропруссидом в фосфорном буфере; 2) реагент 3: раствор NaCl и NaOH; 3) стандартный раствор мочевины (8,33 ммоль/л).

Материал исследования

Сыворотка крови, моча (разведение 1:50).

Оборудование

Микроколориметр МКМФ-02М.

Проведение анализа

	Проба 1, мл	Проба 2, мл	Стандарт, мл
Рабочий реактив	0,5	0,5	0,5
Сыворотка крови	0,01	—	—
Моча (разведение 1:50)	—	0,01	—
Стандартный раствор мочевины	—	—	0,01
	Перемешивают. Инкубируют точно 5 мин при 37 ⁰ С.		
Реагент 3	0,1	0,1	0,1
	Перемешивают. Выдерживают точно 5 мин при 37 ⁰ С.		
Дистиллированная вода	3,0	3,0	3,0
	Измеряют оптическую плотность проб против воды при 610 нм		

Расчет

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

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

$E_{\text{оп}}$ – оптическая плотность пробы, $E_{\text{ст}}$ – оптическая плотность стандарта, $C_{\text{ст}}$ – концентрация стандартного раствора, 50 – разведение мочи, D – величина диуреза (1300-1500 мл/сут).

Нормальные величины

Сыворотка крови

Дети 1,8–6,4 ммоль/л

Взрослые 2,5–8,3 ммоль/л

Моча 330–580 ммоль/сут

Клинико-диагностическое значение

Уровень мочевины в сыворотке крови и моче зависит от скорости её синтеза в печени и выделения через почки, от величины и направленности белкового обмена.

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).

Определение мочевины *в моче* позволяет следить за состоянием процессов анаболизма и катаболизма белков в организме. *Повышение* концентрации мочевины в моче наблюдается при отрицательном азотистом балансе, при избыточном белковом питании, в послеоперационный период, при гиперфункции щитовидной железы, при лихорадке, голодании.

Уменьшение выделения мочевины свидетельствует о положительном азотистом балансе и наблюдается во время беременности, в период роста.

Оформление работы

Указывают принцип метода, проведение анализа, нормальные величины и результаты исследования, сопоставляют полученные значения с нормальными величинами и делают вывод о возможной патологии.

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)

Оборудование

Микроколориметр МКМФ-02М.

Проведение анализа

	ОПЫТ, мл	СТАНДАРТ, мл
Моча	0,5	–
Стандартный раствор креатинина	–	0,5
Дистиллированная вода	0,5	0,5
Раствор 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:

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

$E_{\text{оп}}$ – 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, дегенерации и амилоидозе почек, лейкемии, 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 Леша-Нихана.

Цель

Освоение методов качественного и количественного определения мочевой кислоты.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Пищевые источники нуклеопротеинов. Переваривание нуклеиновых кислот пищи, нуклеазы пищеварительного тракта и тканей. Химизм синтеза пуриновых нуклеотидов. Химизм распада пуриновых нуклеотидов и образование мочевой кислоты. Регуляция процесса. Молекулярные механизмы нарушений метаболизма пуриновых нуклеотидов: подагра, синдром Леша-Нихана. Применение аллопуринола для лечения подагры. Химизмы процессов синтеза и распада пиримидиновых нуклеотидов. Нарушение синтеза пиримидиновых нуклеотидов – оротатацидурия. Биосинтез дезоксирибонуклеотидов, роль тиоредоксина. Применение ингибиторов синтеза дезоксирибонуклеотидов для лечения злокачественных опухолей.

Вопросы для самоконтроля

1. Переваривание нуклеопротеинов в желудочно-кишечном тракте.
2. Синтез пуриновых нуклеотидов, назвать источники атомов пуринового цикла.
3. Синтез АМФ и ГМФ из ИМФ, превращение нуклеозидмонофосфатов в трифосфаты, их значение для клетки.
4. Биосинтез пиримидиновых нуклеотидов УМФ и ЦМФ, превращение их в трифосфаты.
5. Оротатацидурия, назвать причину нарушения процесса метаболизма пиримидинов.
6. Механизм образования дезоксирибонуклеотидов, роль тиоредоксина и НАДФН₂.
7. Синтез дТМФ, назвать ферменты, катализирующие процесс, роль метилен–ТГФК и S-аденозилметионина.
8. Регуляция синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов по типу обратной связи, ее особенности.
9. Назвать нуклеотидные коферменты, охарактеризовать их функции.
10. Катаболизм пуриновых нуклеотидов, указать содержание мочевой кислоты в крови и моче.
11. Молекулярные механизмы развития мочекаменной болезни, синдрома Леша-Нихана, подагры. Указать диету при гиперурикемии, причины эффективности аллопуринола при лечении подагры.
12. Катаболизм пиримидиновых нуклеотидов, конечные продукты процесса, указать их утилизацию.
13. Назвать лекарственные препараты ингибиторы синтеза пуриновых нуклеотидов.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Лабораторная работа Количественное определение мочевой кислоты в сыворотке крови и моче

Принцип

Мочевая кислота расщепляется ферментом уриказой до аллантаина с одновременным образованием пероксида водорода, который при участии пероксидазы взаимодействует с дихлоргидроксibenзолсульфонатом и 4-аминоантипирином с образованием окрашенных в розово-малиновый цвет продуктов. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию мочевой кислоты и определяется фотоколориметрически.

Реактивы

1) рабочий реактив, содержащий фенол, уриказу, пероксидазу, дихлоргидроксibenзолсульфонат и 4-аминоантипирин в калиево-фосфатном буфере; 2) стандартный раствор мочевой кислоты, 500 мкмоль/л.

Материал исследования

Сыворотка крови, моча (разведение 1:5).

Оборудование

Микроколориметр МКМФ-02М.

Проведение анализа

	Опыт 1, мл	Опыт 2, мл	Стандарт, мл
Сыворотка крови	0,025	–	–
Моча (разведение 1:5)	–	0,025	–
Стандартный р-р мочевой кислоты	–	–	0,025
Рабочий реактив	1,0	1,0	1,0
	Выдерживают 10 минут при температуре 37° С. Измеряют оптическую плотность проб против воды при длине волны 540 нм (зеленый светофильтр)		

Расчет

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

$$[\text{Концентрация мочевой кислоты мочи, ммоль/сут}] = \frac{E_{\text{оп}} \times 5 \times D}{E_{\text{ст}} \times 1000} \times C_{\text{ст}}, \text{ где}$$

$E_{\text{оп}}$ и $E_{\text{ст}}$ – оптическая плотность опытной и стандартной проб,
 $C_{\text{ст}}$ – концентрация мочевой кислоты в стандартной пробе, 5 – разведение мочи, 1000 – коэффициент пересчета мкмоль в ммоль,
 D – суточный диурез (1,3–1,5 л/сут).

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 рН 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 ксантин 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 гемопротеинов; 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 P450, являясь по структуре гемопротеином, он содержит протетическую 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 P450 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.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Общая характеристика сложных белков – хромопротеинов. Особенности строения и разнообразие гемопротеинов, их локализация и биологические функции. Химическое строение гема. Молекулярное строение гемоглобина в сравнении с миоглобином. Кооперативные изменения конформации протомеров гемоглобина при присоединении кислорода. Физиологические формы гемоглобина. Аномальные формы гемоглобина. Гемоглобинопатии. Химизм синтеза гема гемоглобина, регуляция синтеза. Обмен железа: транспорт, депонирование. Превращение гемоглобина в тканях. Химизм распада гемопротеинов в тканях: образование билирубина, формы билирубина, локализация их образования. Роль фермента УДФ-глюкурозилтрансферазы в превращении билирубина. Выведение конечных продуктов распада гема. Нарушение обмена желчных пигментов. Диагностическое значение определения желчных пигментов, дифференциация желтух.

Вопросы для самоконтроля

1. Особенности строения гемсодержащих белков, строение гема.
2. Разнообразие гемопротеинов (гемоглобин, миоглобин, цитохромы, каталаза), их локализация и биологическая роль.
3. Физиологические и аномальные типы гемоглобина («метгемоглобинемия», «серповидно-клеточная анемия» и др.).
4. Биологическая функция гемоглобина, производные формы гемоглобина.
5. Синтез гема и гемоглобина, указать регуляцию процесса, привести примеры нарушений синтеза.

6. Обмен железа: всасывание, транспорт, депонирование, суточная потребность.
7. Распад гемоглобина, особенности форм билирубина, их свойства и локализация процесса образования.
8. Назвать роль фермента УДФ-глюкуронилтрансферазы в превращении билирубина.
9. Характеристика пути выведения конечных продуктов распада гема из организма.
10. Нарушения обмена желчных пигментов, классификация и особенности форм желтух.
11. Диагностическое значение определения желчных пигментов в крови и моче, дифференциация желтух.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

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.

Оборудование

Микроколориметр МКМФ-02М.

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:

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

$E_{\text{оп}}$ и $E_{\text{ст}}$ – оптическая плотность опытной и стандартной проб,

C_{CT} —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**

В норме содержание общего билирубина в сыворотке крови составляет 8,5–20,5 мкмоль/л. Из этого количества 78 % приходится на долю непрямого (свободного) билирубина.

Принцип

При взаимодействии сульфаниловой кислоты с азотистым натрием образуется диазофенилсульфоновая 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 непрямо 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 и кофеин бензоат (реагент № 1), 2) натрий азотисто-кислый, $NaNO_2$ (реагент № 2), 3) сульфаниловая кислота (реагент № 3), 4) 0,9 % раствор $NaCl$, 6) стандартный раствор билирубина, 32 мкмоль/л.

Оборудование

Микроколориметр МКМФ-02М.

Проведение анализа

Реактивы	Стандартная проба проба №1	Прямой билирубин проба №2	Общий билирубин проба №3
Сыворотка	–	0,2	0,2
Стандартный раствор билирубина	0,2	–	–
Реагент №1 (сульфаниловая кислота+кофеина бензоат)	1,0	–	1,0
Реагент №2 ($NaNO_2$)	1 капля	1 капля	1 капля
Реагент №3 (сульфаниловая кислота)	–	0,5	–

NaCl	1,0	1,0	1,0
------	-----	-----	-----

Общий билирубин и стандарт выдерживаем 20 минут. Прямой билирубин смотрят через 7 минут. Колориметрируют при 540 нм (зеленый светофильтр).

Расчет:

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

$E_{\text{оп}}$ – оптическая плотность пробы, $E_{\text{ст}}$ – оптическая плотность стандарта, $C_{\text{ст}}$ – концентрация стандартного раствора билирубина, 32 мкмоль/л.

Нормальные величины

Общий билирубин

Сыворотка крови

Дети

Доношенные

Недоношенные

Кровь из пуповины

< 34,2 мкмоль/л

< 34,2 мкмоль/л

Возраст до 5 дней

< 205,2 мкмоль/л

< 273,6 мкмоль/л

Впоследствии

3,4–17,1 мкмоль/л

Взрослые

8,5–20,5 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 «Иктофан»

Принцип

В основе метода лежит та же качественная реакция на билирубин, что и при определении билирубина в сыворотке крови.

Материал исследования

Свежая моча нормальная и патологическая с желчными пигментами (не позднее 4 часов после сбора материала).

Реактивы

Диагностические полоски «Иктофан».

Проведение реакции

Диагностическую полоску погружают в исследуемую мочу и немедленно вынимают. Спустя 2 минуты 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, В₁₂-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. (табл. 1).

Таблица 1

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

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. ГИДРОЛИЗ БЕЛКОВ В ЖЕЛУДКЕ ПРОИСХОДИТ ПОД ВЛИЯНИЕМ ФЕРМЕНТА

- 1) пепсиногена
- 2) трипсина
- 3) пепсина
- 4) энтерокиназы

2. ЭНДОПЕПТИДАЗОЙ ПО ДЕЙСТВИЮ ЯВЛЯЕТСЯ ФЕРМЕНТ

- 1) трипсиноген
- 2) трипсин
- 3) карбоксипептидаза
- 4) химотрипсиноген

3. ЭКЗОПЕПТИДАЗОЙ (С С-КОНЦА) ЯВЛЯЕТСЯ ФЕРМЕНТ

- 1) карбоксипептидаза
- 2) дипептидаза
- 3) аминопептидаза
- 4) химотрипсин

4. СВОЙСТВЕННЫЙ ЧЕЛОВЕКУ ПУТЬ ДЕЗАМИНИРОВАНИЯ
АМИНОКИСЛОТ

- 1) внутримолекулярный
- 2) окислительный
- 3) гидролитический
- 4) восстановительный

5. ПРЯМОМУ ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ ДЕЗАМИНИРОВАНИЮ
ПОДВЕРГАЕТСЯ

- 1) лейцин
- 2) валин
- 3) глутамат
- 4) серин
- 5) аспарат

6. ТИРОЗИН ЯВЛЯЕТСЯ СИНТЕТИЧЕСКИМ ПРЕДШЕСТВЕННИКОМ

- 1) тироксина
- 2) инсулина
- 3) адреналина
- 4) норадреналина
- 5) альдостерона

7. ИЗ ТРИПТОФАНА ОБРАЗУЕТСЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЕ
ВЕЩЕСТВО

- 1) кортикостерон
- 2) тироксин
- 3) серотонин
- 4) гистамин

8. МЕДИАТОР ГАМК ОБРАЗУЕТСЯ ПРИ ДЕКАРБОКСИЛИРОВАНИИ

- 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) мочевины
- 3) креатин
- 4) аммиак

13. МОЧЕВАЯ КИСЛОТА ЯВЛЯЕТСЯ КОНЕЧНЫМ ПРОДУКТОМ

- 1) орнитинового цикла
- 2) распада пуриновых нуклеотидов
- 3) распада пиримидиновых нуклеотидов

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

Задача № 1

Больного беспокоят боли в области желудка, отрыжка с неприятным запахом «тухлых яиц».

Объяснить, какие процессы могут быть причиной таких симптомов. Что следует рекомендовать для нормализации процессов пищеварения?

Задача № 2

При анализе мочи пациента обнаружено повышенное количество индикана.

Объяснить возможные причины индиканурии.

Задача № 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.

Объяснить, активность каких аминотрансфераз и почему может измениться в крови при заболевании сердца.

Задача № 4

У больного при поступлении в стационар жалобы на аллергические явления.

Объяснить причину состояния, какой биогенный амин и активность какого фермента целесообразно определить.

Задача № 5

У ребенка содержание в крови фенилаланина 5 мкмоль/л (при норме 0,2 мкмоль/мл), с мочой выделяется большое количество этой аминокислоты.

Объяснить причину, какие процессы обмена нарушены, как называется заболевание, как вскармливать ребёнка.

Задача № 6

В стационар поступил больной в состоянии интоксикации, с такими симптомами как, головокружение, тошнота, рвота, повышенная возбудимость, судорожные состояния.

Дать название патологическому состоянию. Объяснить причину 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 качественного обнаружения гормонов.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Роль гормонов в регуляции обмена веществ. Общие биологические признаки гормонов. Классификация гормонов по их химическому строению, биологическим функциям и месту образования. Иерархия регуляторных систем. Нейроэндокринные связи, роль гормонов гипоталамуса и гипофиза. Механизмы межгормональных положительных (прямых) и отрицательных (обратных) взаимосвязей.

Современные представления о механизме передачи гормонального сигнала в клетку-мишень. Системы вторичных посредников. Характеристика гормонов центральных эндокринных желез: гипоталамуса, гипофиза; и периферических эндокринных желез: щитовидной, паращитовидной желез, поджелудочной железы, мозгового вещества надпочечников. Химическое строение гормонов (адреналина, T_3 , T_4), иметь представление о структуре других гормонов. Биологические функции гормонов, нарушения метаболизма при гипо- и гиперфункции эндокринных желез. Изменения метаболизма в абсорбтивный и постабсорбтивный периоды. Изменения гормонального статуса и метаболизма при сахарном диабете. Схемы механизмов передачи гормонального сигнала в клетку: аденилатциклазной системы, инозитолфосфатной системы, через рецепторы обладающие каталитической активностью, через внутриклеточные рецепторы и др.

Вопросы для самоконтроля

1. Понятие «гормон», указать общие биологические признаки гормонов.
2. Классификации гормонов по химическому строению, принадлежности к эндокринным железам и биологическим функциям.

3. Характеристика уровней иерархии в системе нейроэндокринной регуляции обмена веществ.
4. Нейроэндокринные взаимосвязи: прямая (положительная) и обратная (отрицательная) межгормональные взаимосвязи, привести примеры.
5. Механизмы передачи гормональных сигналов в клетку, расположение рецепторов, примеры систем вторичных посредников и их взаимодействие (цАМФ, цГМФ, ДАГ, ИФ₃, ионы Ca²⁺).
6. Гормоны гипоталамуса и гипофиза, их химическая природа и биологическая роль, гипо- и гиперфункции гипофиза (гипофизарный нанизм, акромегалия, гигантизм).
7. Химическая природа, регуляция образования, механизмы биологических эффектов вазопрессина и окситоцина, причина несахарного диабета.
8. Гормоны щитовидной железы, строение трийодтиронина и тироксина, синтеза и катаболизма гормонов, регуляцию их образования, биологическое действие, гипо- и гиперфункции щитовидной железы (кретинизм, микседема, базедова болезнь).
9. Химическая природа, участие в регуляции обмена кальция и фосфатов гормонов паратгормона и кальцитонина, роль витамина D, основные симптомы гипо- и гиперпаратиреозидизма.
10. Гормон поджелудочной железы – глюкагон, его химическая природа, участие в регуляции обмена веществ, механизм гипергликемического действия.
11. Гормон поджелудочной железы – инсулин, его химическое строение, образование из проинсулина, регуляция синтеза и секреции, органы-мишени и механизм действия гормона, роль в регуляции обмена углеводов, липидов и белков, биохимические механизмы анаболических эффектов инсулина.
12. Формы сахарного диабета, возможные причины инсулиновой недостаточности, клинические симптомы и основные биохимические признаки сахарного диабета, его осложнения.
13. Гормоны мозгового слоя надпочечников, строение и синтез адреналина, органы-мишени, роль в обмене веществ, механизмы гипергликемии и липолитического действия гормона.
14. Участие гормона адреналина в адаптивных реакциях при стрессе.

Задание для самоподготовки

Составьте таблицу по приведенной схеме:

Название и химическая природа	Место синтеза	Органы-мишени	Локализация рецепторов, механизм действия	Влияние на обмен веществ				Болезни, обусловленные гипо- или гиперфункцией гормона

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Лабораторная работа

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 CuSO₄, 3) реактив Фоля, содержащий 5 % раствор (CH₃COO)₂Pb и 30 % раствор NaOH, 4) концентрированная HNO₃, 5) раствор натрия нитропруссид, 6) реактив Миллона – раствор нитратов ртути (I) и (II) в HNO₃ с примесью HNO₂, 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 CuSO₄.

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.

РЕАКЦИИ НА СЕРОСОДЕРЖАЩИЕ АМИНОКИСЛОТЫ

Принцип

Сульфгидрильные группы в инсулине подвергаются щелочному гидролизу, в результате чего происходит отщепление серы в виде сульфида натрия Na_2S , который вступает в дальнейшие реакции.

Проведение анализа

Раствор инсулина и 5 капель 30 % раствора NaOH кипятят 1-2 минуты. Разделяют содержимое на 2 части для реакций «А» и «Б».

А. РЕАКЦИЯ ФОЛЯ

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

Б. РЕАКЦИЯ С НИТРОПРУССИДОМ

К 5 каплям гидролизата инсулина добавляют 2–3 капли раствора натрия нитропрусида. Отмечают появление красно-коричневого окрашивания.

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

Освоение методов обнаружения стероидных гормонов и продуктов их метаболизма.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Стероидные гормоны, химическое строение основных представителей, особенности регуляции их секреции, биосинтез (стероидогенез) и представление о катаболизме. Роль гипоталамо-гипофизарной системы в регуляции образования и секреции стероидных гормонов. Механизм передачи стероидными гормонами сигнала в клетку-мишень. Гормоны коры надпочечников: глюкокортикоиды. Химическая структура глюкокортикоидов (на примере кортизола). Биологическая функция глюкокортикоидов. Регуляция глюконеогенеза глюкокортикоидами. Роль этих гормонов в адаптационном синдроме (исследования Г. Селье). Гипо- и гиперкортицизм, нарушения метаболизма. Химическая структура минералокортикоидов (на примере альдостерона). Регуляция образования и секреции альдостерона (ренин-ангиотензивная система). Биологическая функция минералокортикоидов,

механизм действия альдостерона. Половые гормоны. Химическая структура, на примере женского полового гормона эстрадиола и мужского гормона тестостерона. Роль гипоталамо-гипофизарной системы в регуляции синтеза и секреции женских и мужских половых гормонов. Биологическая функция половых гормонов. Практическое использование стероидных гормонов в медицине.

Вопросы для самоконтроля

1. Какой процесс называется «стероидогенезом»? Назвать основные направления и ключевые метаболиты, определяющие образование отдельных групп стероидов.
2. Роль гипоталамо-гипофизарной системы и механизмы прямой и отрицательной обратной связи в регуляции секреции стероидных гормонов.
3. Глюкокортикоиды, основные представители, органы-мишени, механизм передачи гормонального сигнала, регуляция метаболизма.
4. Характеристика механизма развития гипергликемии под влиянием глюкокортикоидов.
5. Почему препараты глюкокортикоидной природы противопоказаны больным сахарным диабетом?
6. Назвать роль глюкокортикоидов в адаптационном синдроме (исследования Г.Селье), гипо- и гиперкортицизм, нарушение метаболизма. Какое состояние называют стероидным диабетом?
7. Глюкокортикоиды – лекарственные препараты, механизм противовоспалительного и антиаллергического действия глюкокортикоидов.
8. Минералокортикоиды, основные представители, органы-мишени, механизм их действия в регуляции водно-солевого обмена.
9. Ренин-ангиотензиновая система, ее роль в регуляции синтеза и секреции альдостерона, гипо- и гиперальдостеронизм.
10. Женские половые гормоны, основные представители, особенности регуляции секреции, место их образования, органы-мишени, биологическая роль в обеспечении репродуктивной функции организма женщины и влияние на обмен веществ.
11. Привести примеры применения синтетических аналогов эстрогенов и прогестинов в качестве контрацептивов.
12. Мужские половые гормоны, основные представители, особенности регуляции секреции и место образования, органы-мишени, механизм действия и биологическая роль.
13. Анаболические стероиды в качестве лекарственных препаратов, побочные эффекты их применения, показания к применению.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Лабораторная работа

Качественные реакции определения фолликулина

Реактивы

- 1) 30 % раствор NaOH, 2) реактив Фолина, 3) концентрированная H₂SO₄,
- 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 флуоресценцией.

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. H₂SO₄ и вновь помещают пробирку в кипящую водяную баню на 5–10 мин. Постепенно появляется соломенно-желтое окрашивание, переходящее в оранжевое. Поднося пробирку к флуороскопу, наблюдают зеленую флуоресценцию.

С масляным раствором фолликулина реакцию проводят при комнатной температуре. К 2 каплям масляного раствора фолликулина прибавляют 30 капель конц. H₂SO₄. Постепенно появляется соломенно-желтое окрашивание.

КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ С РЕАКТИВОМ ФОЛИНА

Принцип

Фолликулин восстанавливает фосфорно-вольфрамовый 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 *p*-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 *p*-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 трийодтиронина 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 паращитовидных 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, силаболин 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).

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 как 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

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. СТЕРОИДАМИ ПО ХИМИЧЕСКОЙ ПРИРОДЕ ЯВЛЯЮТСЯ ГОРМОНЫ

- 1) норадреналин
- 2) вазопрессин
- 3) гастрин
- 4) эстрон
- 5) тестостерон

2. ПРОИЗВОДНЫМИ АМИНОКИСЛОТЫ ТИРОЗИНА ПО СТРОЕНИЮ ЯВЛЯЮТСЯ

- 1) адреналин
- 2) норадреналин
- 3) кортикостерон
- 4) трийодтиронин
- 5) серотонин

3. АРАХИДОНОВАЯ КИСЛОТА ЯВЛЯЕТСЯ СИНТЕТИЧЕСКИМ ПРЕДШЕСТВЕННИКОМ

- 1) пролактина
- 2) простагландинов
- 3) соматостатина
- 4) секретина

4. ОСТРОВКОВАЯ ТКАНЬ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРОДУЦИРУЕТ

- 1) вазопрессин
- 2) глюкагон
- 3) инсулин
- 4) окситоцин

5. ВОДНО - СОЛЕВОЙ ОБМЕН РЕГУЛИРУЕТ ГОРМОН

- 1) тироксин
- 2) инсулин
- 3) альдостерон
- 4) кортикостерон
- 5) глюкагон

6. ФОСФОРНО-КАЛЬЦИЕВЫЙ ОБМЕН РЕГУЛИРУЮТ ГОРМОНЫ

- 1) паратгормон
- 2) кальцитонин

- 3) адренкортикотропин
- 4) тестостерон
- 5) прогестерон

7. ВОДНЫЙ БАЛАНС И ОСМОТИЧЕСКОЕ ДАВЛЕНИЯ РЕГУЛИРУЕТ

- 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) в яичниках
- 5) в коре надпочечников

10. ПРИ АТРОФИИ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ РАЗВИВАЕТСЯ

- 1) кретинизм
- 2) микседема
- 3) ксерофтальмия
- 4) болезнь Аддисона
- 5) тетания

11. ГОРМОНЫ СТЕРОИДНОЙ ПРИРОДЫ СИНТЕЗИРУЮТСЯ В

- 1) щитовидной железе
- 2) поджелудочной железе
- 3) семенниках
- 4) мозговом веществе надпочечников
- 5) 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. БИОСИНТЕЗА ГЛИКОГЕНА РЕГУЛИРУЕТ ГОРМОН

- 1) адреналин
- 2) норадреналин
- 3) холецистокинин
- 4) инсулин
- 5) тироксин

15. БИОСИНТЕЗ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ В КОРЕ НАДПОЧЕЧНИКОВ СТИМУЛИРУЕТ

- 1) адренкортикотропин
- 2) тиреотропин
- 3) кортиколиберин
- 4) кортикостерон

16. ЛИПОЛИЗ В ЖИРОВОЙ ТКАНИ СТИМУЛИРУЕТ ГОРМОН

- 1) адреналин
- 2) инсулин
- 3) альдостерон
- 4) вазопрессин

17. ПОСТУПЛЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ В МЫШЦЫ И ЖИРОВУЮ ТКАНЬ ОБЕСПЕЧИВАЕТ

- 1) кортизол
- 2) глюкагон
- 3) инсулин

18. КАТАБОЛИЗМ БЕЛКОВ В ЛИМФОИДНОЙ ТКАНИ УСИЛИВАЮТ ГОРМОНЫ

- 1) глюкокортикоиды
- 2) минералокортикоиды
- 3) половых желез
- 4) щитовидной железы

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

Задача № 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.

Задача № 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.

Объяснить причину указанных симптомов. О заболевании какой эндокринной железы можно думать?

Задача № 3

При обследовании мальчика 5 лет врач отметил значительное отставание умственного развития, роста. Ребенок малоактивен. В крови содержание холестерина снижено. Общий обмен понижен.

Объяснить причину нарушения.

Задача № 4

Больной сахарным диабетом жалуется на постоянную жажду, потребление большого количества воды (полидипсия), увеличение количества мочи (полиурия), постоянно повышенный аппетит.

Объяснить причину симптомов и повышенного содержания глюкозы в крови.

Задача № 5

Врач рекомендовал больному сахарным диабетом с избыточной массой тела соблюдать диету и ограничить потребление углеводов.

Объяснить, могут ли переизбыток и ожирение способствовать развитию сахарного диабета?

Задача № 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.

Объяснить причину 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 метода определения активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Белки крови: происхождение, содержание, состав, функции.

Нормальные величины общего белка крови, методы количественного определения, диагностическое значение. Причины патологических состояний гипо- и гиперпротеинемий, их виды. Парапротеинемии, примеры белков парапротеинов. Белки острой фазы. Диспротеинемии, дислипидопропротеинемии методы их выявления. Основные белковые фракции сыворотки крови, получаемые электрофорезом. Изменения количественного и качественного состава белков крови, причины их вызывающие. Ферменты крови, их происхождение, значение определения активности ряда ферментов в диагностической практике. Небелковые азотистые вещества крови. Понятие "остаточный азот крови", его состав, диагностическое значение определения. Азотемии и их виды. Безазотистые вещества крови.

Вопросы для самоконтроля

1. Что называют «кровью»?
2. Что называют «плазмой»?
3. Что называют «сывороткой»?
4. Основные белки плазмы крови, их функции.
5. Методы количественного определения общего белка крови, их диагностическое значение.
6. Причины развития патологических состояний: гипопротеинемии и гиперпротеинемии, их виды.
7. Парапротеинемии, привести примеры парапротеинов, назвать методы их выявления.
8. Какие патологические состояния называются диспротеинемиями? Методы их выявления, диагностическое значение.

9. Методы фракционирования белков, основные белковые фракции сыворотки крови.
10. Изменения состава белков крови при нефрозе, циррозе печени, белковом голодании, миеломной болезни, острой инфекции.
11. Какие патологические состояния называются дислиппротеинемиями? Методы их выявления, диагностическое значение.
12. Какую группу белков называют белками острой фазы? Привести примеры, назвать методы их выявления и диагностическое значение.
13. Классификация ферментов крови, привести примеры.
14. Происхождение ферментов крови, охарактеризовать индикаторные ферменты, их диагностическое значение.
15. Понятие «остаточный азот крови», его фракции, диагностическое значение определения остаточного азота.
16. Какое состояние называют азотемией? Назвать виды азотемий, причины их развития.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Лабораторная работа 1

Определение активности щелочной фосфатазы

Фосфатазы катализируют гидролиз органических эфиров фосфорной кислоты: фосфоэтаноламин, пирофосфаты, пиридоксаль-5-фосфат, β-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, 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».

Оборудование

Микроколориметр МКМФ-02М.

Проведение анализа

	ОПЫТ, мл	КОНТРОЛЬ, мл
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

$$[\text{Активность ЩФ, мккат/л}] = 10,263 \times (E_{\text{ОПЫТ}} - E_{\text{КОНТРОЛЬ}}), \text{ где}$$

$E_{\text{ОПЫТ}}$ – 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.

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 α_1 - и α_2 -глобулиновой фракции связано с острыми и подострыми воспалительными процессами и некоторыми злокачественными опухолями, травмами, так как сюда входит большинство белков острой фазы (С-реактивный белок, α_2 -макроглобулин, α_1 -гликопротеин, α_1 -антитрипсин, церулоплазмин, гаптоглобин). Большая часть белков β -глобулиновой фракции является β -липопротеинами, поэтому повышение этой фракции чаще всего связано с гиперлипопротеинемиями. Кроме того, влияние на динамику этой фракции оказывают трансферрин, гемопексин, компоненты системы комплемента. Фракция γ -глобулинов увеличивается при патологических состояниях, связанных с хроническими воспалительными процессами, так как содержит иммуноглобулины G, A и M.

В клинической практике для сыворотки выделяют 9 типов протеинограмм, соответствующих различным патологическим состояниям:

1-й тип – соответствует острым воспалительным процессам. Характеризуется значительным уменьшением содержания альбуминов и большей выраженностью фракций α_1 - и α_2 -глобулинов; в поздние стадии заболевания обычно отмечается увеличение γ -глобулинов. Этот тип протеинограмм свойствен начальным стадиям пневмоний, острым полиартритам, экссудативному туберкулезу легких, острым инфекционным заболеваниям, сепсису, обширному инфаркту миокарда.

2-й тип – характерен для хронического воспаления. Отличается умеренным уменьшением фракции альбуминов и выраженным увеличением уровня α_2 - и γ -глобулинов. Этот тип электрофореграмм соответствует поздней стадии пневмоний, хронического туберкулеза легких, хронического эндокардита, холецистита, цистита и пиелита.

3-й тип – отражает нарушение функций почечного фильтра. Характеризуется значительным уменьшением содержания альбуминов, повышением концентрации α_2 - и β -глобулинов при умеренном снижении уровня γ -глобулинов. Этот тип электрофореграмм свойствен липоидному или амилоидному нефрозам, нефритам, нефросклерозу, токсикозам беременности, терминальным стадиям туберкулеза легких, кахексиям и ряду других заболеваний.

4-й тип – соответствует злокачественным новообразованиям. Обнаруживается резкое снижение содержания альбуминов при значительном

увеличении всех глобулиновых фракций. Наиболее высокого подъема достигает уровень β -глобулинов. Этот тип протеинограмм сопровождает метастатические новообразования с различной локализацией первичной опухоли.

5-й тип – характерен для γ -глобулиновых плазмоцитом. Отличается значительным уменьшением концентрации альбуминов, α - и β -глобулинов при увеличении содержания γ -глобулинов. Он типичен для γ -плазмоцитом, макроглобулинемии и некоторых ретикулезозов.

6-й тип – свойствен β -глобулиновым плазмоцитомам. Обнаруживается уменьшением уровня альбуминов и большинства глобулиновых фракций, лишь фракция β -глобулинов претерпевает резкое избирательное увеличение. Данный тип электрофореграмм присущ β_1 -плазмоцитомам, β_1 -плазмноклеточной лейкемии и макроглобулинемии Вальденштрема.

7-й тип – характерен для гепатитов. Отражает умеренное уменьшение содержания альбумина, увеличение уровня γ -глобулинов и менее выраженное – β -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-й тип – соответствует некрозу печени. Отмечается значительное снижение альбуминов при сильном повышении γ -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-й тип – характерен для механической желтухи. Отличается комплексом изменений, состоящих в уменьшении уровня альбуминов и умеренном увеличении содержания α_2 -, β - и γ -глобулинов. Этот тип электрофореграмм присущ обтурационной желтухе, а также желтухам, вызванным 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 γ - и β -глобулиновыми фракциями (M-градиент) (при миеломной болезни) или попадают во фракцию γ -глобулинов – гипергаммаглобулинемия реактивного характера (ревматоидный артрит, опухоли). Группа заболеваний, при которых в крови обнаруживаются парапротеины, еще недостаточно хорошо изучена. Наиболее известны миеломная болезнь (плазмоцитомы) 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 40–60⁰С и при дальнейшем нагревании до 85–100⁰С снова растворяется.

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 α -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 α -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 (табл. 2).

Индивидуальные представители белковых фракций крови

Альбумины	Глобулины			
	α_1	α_2	β	γ
Преальбумины Постальбумины Альбумин	α_1 -липопротеин α_1 -кислый протеин (серомукоид) α_1 -гликопротеин транскортин протромбин антиплазмин антитрипсин витамин В ₁₂ -связывающий белок	Гаптоглобин (Нр-1,1, Нр-1-2, Нр-2-2) церулоплазмин α_2 -липопротеин α_2 -НС-гликопротеин α_2 -М-глобулин холинэстераза щелочная фосфатаза проакцелерин фактор Кристмаса С-реактивный белок	β_1 А-глобулин β -липопротеин β_1 В-глобулин трансферрин плазминоген проконвертин фибриноген щелочные комплексы С ₁ -С ₄ гемопексин	Г-иммуноглобулин А-иммуноглобулин D-иммуноглобулин Е-иммуноглобулин

Название белка	Место синтеза	Функция	Нормальное содержание	Клинико-диагностическое значение	
				Факторы, повышающие уровень	Факторы, снижающие уровень
Кислый α_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
α_1 -антитрипсин (α_1 -протеиназный ингибитор),	Печень	Составляет 92–94 % от общей антипротеолитической функции крови. Угнетает активность трипсина, химотрипсина, калликреина, 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

Название белка	Место синтеза	Функция	Нормальное содержание	Клинико-диагностическое значение	
				Факторы, повышающие уровень	Факторы, снижающие уровень
Альбумин	Печень	Коллоидно-осмотическая регуляция, резервный белок. Транспорт катионов, жирных кислот, витамина С, лекарств, гормонов щитовидной железы	37–53 г/л (ср.44)	Острое обезвоживание, прием анаболических стероидов	Большие потери белка кровотечение, болезни почек, ожоги, шок. Нарушение синтеза альбумина при циррозе печени. Увеличение скорости его распада, гиперкортицизм
С-реактивный белок (СРБ)	печень	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)
α_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

Название белка	Место синтеза	Функция	Нормальное содержание	Клинико-диагностическое значение	
				Факторы, повышающие уровень	Факторы, снижающие уровень
Гаптоглобин представлен 3 генетически обусловленными формами Hp1-1, Hp2-1, Hp2-2.		Связывает гемоглобин и катепсины, транспортирует витамин В ₁₂	1,0–2,3 г/л (ср.1,7 г/л)	Системные ревматоидные заболевания, нефротический синдром, туберкулез	Гемолитическая анемия, заболевания печени, наследственная недостаточность, острая малярия
Трансферрин	печень	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	печень	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. ФУНКЦИИ 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.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Функции крови. Электролитный состав плазмы крови: макро- и микроэлементы и их роль в обмене веществ. Дыхательная функция крови: транспорт кислорода, углекислого газа (диоксида углерода). Кислотно-основное состояние организма (КОС), показатели оценки КОС (табл. 3). Химические и физиологические пути компенсации нарушений КОС (роль почек, легких и других органов). Буферные системы крови (гемоглобиновая, бикарбонатная, белковая, фосфатная), механизмы их действия. Физиологические систем компенсации: перенос CO_2 с кровью и его выделение через легкие, аммиогенез. Основные виды нарушений кислотно-основного состояния – респираторный (дыхательный) ацидоз и алкалоз, метаболический ацидоз и алкалоз, причины. Кровь как источник лекарственных препаратов, примеры лекарственных препаратов.

Таблица 3

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	pCO_2	Давление CO_2 в газовой смеси, находящейся в равновесии с плазмой артериальной крови при температуре 38°C. Отражает	36–44 мм рт.ст.

Показатель	Принятое обозначение	Характеристика и условие измерения	Нормальные величины
газа		концентрацию углекислоты в крови, зависящей от вентиляции легких и диффузии CO_2 в воздух альвеол. Изменяется при нарушении дыхания и доставке углекислоты к легким	
Актуальные бикарбонаты	AB	Концентрация HCO_3^- в крови при 38°C и реальных (данных) значениях pH и pCO_2	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 pCO_2 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	BB	Сумма всех анионов цельной крови, обладающих буферными свойствами при условии полного насыщения крови 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 , pH 7,38, pCO_2 40 мм рт.ст.)	
Избыток (дефицит) буферных	BE	Различие между фактической величиной BB и их нормальным значением ($\text{BE}=\text{BB}-\text{NBB}$).	$\pm 2,5$ ммоль/л

Показатель	Принятое обозначение	Характеристика и условие измерения	Нормальные величины
оснований		Положительные значения указывают на избыток оснований, отрицательные – на дефицит оснований. Позволяет оценить величину метаболических нарушений. Предел дефицита, совместимый с жизнью, 30 ммоль/л	

Практическое значение определения показателей кислотно-основного состояния

В соответствии с патогенезом выделяют четыре основных состояния: респираторный ацидоз и алкалоз, метаболический ацидоз и алкалоз (табл. 4, 5). Среди этих нарушений различают острые и хронические, компенсированные и декомпенсированные состояния (\uparrow – увеличение, \downarrow – снижение, N – нормальные значения при компенсированных формах):

Таблица 4

Изменение показателей кислотно-основного состояния при ацидозе и алкалозе

Тип нарушения		pH	pCO ₂	Избыток оснований	[HCO ₃ ⁻]
Метаболический	Ацидоз	\downarrow	\downarrow (или N)	\downarrow	\downarrow
	Алкалоз	\uparrow	\uparrow (или N)	\uparrow	\uparrow
Респираторный	Ацидоз	\downarrow	\uparrow	\uparrow (или N)	\uparrow (или N)
	Алкалоз	\uparrow	\downarrow	\downarrow (или N)	\downarrow (или N)

Таблица 5

Нарушения кислотно-основного состояния и причины их возникновения

Формы нарушений	Причины
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 ацетоксусная кислоты)	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. Нарушения выведения кислых продуктов при острой и хронической почечной

	<p>недостаточности, сопровождающейся задержкой NH_4^+, SO_4^{2-}, HPO_4^{2-} ионов. Дегидратация при рвотах, диарее, сопровождающейся потерей бикарбоната. 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 CO_2 во вдыхаемом воздухе; 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 HCl при рвоте; потеря H^+ в почках избыток минералокортикоидов; дефицит K^+; накопление бикарбонатов при передозировке нейтрализующих ацидоз препаратов</p>
<p>Алкалоз респираторный – характеризуется снижением pCO_2, ниже 38 мм рт.ст. и повышением pH 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; гипервентиляция при гипоксии – анемия, горная болезнь, пониженное содержание O_2 во вдыхаемом воздухе</p>

Вопросы для самоконтроля

1. Назвать биохимические функции крови.
2. Дыхательная функция крови, роль гемоглобина эритроцитов в транспорте O_2 и CO_2 .
3. Осмотическая функция крови, роль белков крови и электролитов.
4. Макро- и микроэлементы крови, их значение в организме, патологические состояния, обусловленные изменением их уровня.
5. Что называют кислотно-основным состоянием организма? Показатели системы КОС.
6. Химические механизмы компенсации системы КОС, механизмы действия буферных систем – бикарбонатной (гидрокарбонатной), фосфатной, белковой, гемоглобиновой (оксигемоглобиновой).
7. Назвать роль Hb в поддержании кислотно-основного состояния (участие в превращении H_2CO_3 в бикарбонаты).
8. Механизмы действия физиологических систем гомеостатической защиты: легких, почек, костной ткани, печени и др.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Лабораторная работа 1

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 фосфорно-ванадиево-молибденовой кислоты желтого цвета. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации неорганического фосфора в пробе и определяется фотометрически.

Материал исследования

Сыворотка крови.

Реактивы

Набор реактивов фирмы «Лахема».

Оборудование

Микроколориметр МКМФ-02М

Проведение анализа

	ОПЫТ, мл	СТАНДАРТ, мл
Сыворотка	0,2	–
Эталонный раствор	–	0,2
Дистиллированная 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

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

$E_{\text{оп}}$ – оптическая плотность пробы, $E_{\text{ст}}$ – оптическая плотность стандарта, $C_{\text{ст}}$ – 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 парацитовидных желез, содержания соматотропина и вазопрессина, регулирующего действия витамина D₃, 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 2 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

	ОПЫТ, мл	КОНТРОЛЬ, мл
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

$$[\text{Хлориды, ммоль/л}] = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{СТ}}} \times C_{\text{СТ}}, \text{ где}$$

$E_{\text{оп}}$ – 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

Задача № 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?

Задача № 2

У больного появились отеки, при обследовании выявлено изменение состава белков крови.

Объяснить причину, назвать состояние.

Задача № 3

Ребенок перенес тяжелое инфекционное заболевание.

Объяснить, какие изменения белковых фракций крови можно ожидать?

Задача № 4

Человека укусил клещ.

Объяснить какой лечебный белковый препарат ему необходимо ввести? Почему?

Задача № 5

У больного обнаружены в плазме крови «патологические белки», не существующие в норме.

Как называется это состояние? О каком заболевании говорит появление миеломных белков?

Задача № 6

При обследовании у пациента в сыворотке крови обнаружен С-реактивный белок.

Объяснить причину, назвать состояние.

Задача № 7

При исследовании крови больного в плазме обнаружено 0,6 ммоль/л мочевой кислоты.

Объяснить причину, назвать состояние.

Задача № 8

У больного тяжелая форма сахарного диабета.

Назвать вид нарушения кислотно-основного состояния.

Задача № 9

У альпиниста при тяжелом подъеме на большую высоту учащенное глубокое дыхание.

Назвать вид нарушения кислотно-основное состояние.

действия АДГ (вазопрессина) в клетках почечных канальцев. Восстановление объема крови при кровопотере и обезвоживании организма. Биохимические механизмы развития почечной гипертензии и принципы фармакологической коррекции. Роль почек в поддержании кислотно-основного состояния: ацидогенез, аммионогенез. Физические и химические свойства нормальной мочи (цвет, запах, плотность, прозрачность, суточное количество, рН). Изменение этих показателей при патологических состояниях. Химический состав мочи здорового человека: органические и неорганические компоненты. Изменение химического состава мочи при патологии – белок, глюкоза, желчные пигменты, кетоновые тела, кровь, ферменты. Биохимические основы применения диуретических лекарственных средств.

Вопросы для самоконтроля

1. Строение функциональной единицы почек – нефрона.
2. Назвать главные процессы образования мочи, указать понятие клиренса.
3. Фильтрация, состав и свойства ультрафильтрата (первичной мочи).
4. Особенности реабсорбции и секреции веществ в проксимальном отделе нефрона.
5. Особенности реабсорбции и секреции веществ в дистальном отделе нефрона, роль гормонов и механизмы их действия.
6. Основные регуляторные механизмы, лежащие в основе образования мочи: ренин-ангиотензиноген-ангиотензиновая система, вазопрессин (антидиуретический гормон), альдостерон, паратгормон, кальцитонин.
7. Роль почек в поддержании кислотно-основного состояния (КОС): ацидогенез, аммионогенез, экскреция кислот.
8. Особенности метаболизма почечной ткани, ферменты и биологически активные вещества.
9. Общие физические свойства мочи здорового человека: количество, цвет, прозрачность, запах, относительная плотность, рН.
10. Химический состав мочи здорового человека: органические компоненты, неорганические компоненты.
11. Количество выделяемой мочи в норме и при патологии (анурия, полиурия, олигурия), ее цвет, плотность при патологических состояниях, а также патогенез этих состояний.
12. Причины аммиачного и гнилостного запахов, а также запаха ацетона мочи.
13. Назвать причины изменения рН мочи при патологии.
14. Назвать причины изменения прозрачности мочи.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

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 рН 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 рН исследуемой мочи.

Нормальные величины

Моча 5,0–7,0

Практическое значение

Известно, что преобладание в пище животных белков определяет сдвиг рН мочи 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

Полуколичественное определение глюкозы

Индикаторная бумага «Гликофан» представляет собой полоски бумаги 0,5x7,5 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 4

Определение содержания кетоновых тел, восстанавливающих веществ, глюкозы, белка, рН с помощью тест-полосок «Пентафан»

Диагностические полоски «Пентафан» имеют 5 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 с 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 5

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

диагностические полоски «Глюкофан».

Проведение анализа

Полоску погружают в исследуемую мочу и немедленно вынимают. Через 20–30 с 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 с 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 6

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 Легалья. Проба более чувствительна к ацетоуксусной кислоте, чем к ацетону, с β -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 жиромобилизирующих 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 Легалья	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 7

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

Задача № 1

Моча пациента А имеет соломенно-желтый цвет, Б – ярко-желтый; В – цвет пива; Г – цвет «мясных помоев».

Объяснить, какие вещества оказывают влияние на цвет мочи.

Задача № 2

Согласно рекомендации врача пациент ограничил употребление мяса, рыбы и значительно увеличил содержание в пище овощей и фруктов.

Объяснить, как изменится рН мочи. Изменится ли содержание в моче мочевины?

Задача № 3

В моче ребенка и взрослого мужчины обнаружены креатинин и креатин.

Объяснить, является ли это отклонением от нормы.

Задача № 4

В моче пациента отмечено существенное увеличение концентрации креатинина.

Объяснить причины креатининурии.

Задача № 5

У больного ребенка в моче методом хроматографии обнаружена фенилпировиноградная кислота, а в крови – фенилаланин (0,4 г/л).

Объяснить причину.

Задача № 6

У больного с мочой за сутки выделяется 1,5 г мочевой кислоты (норма до 0,7 г), повышено ее содержание и в крови. Врач рекомендовал лечебный препарат аллопуринол, а также диету с ограничением мясной пищи.

Какую болезнь Вы диагностируете? Объяснить принцип действия аллопуринола.

РАЗДЕЛ 15. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ

ТЕМА 15.1. БИОТРАНСФОРМАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

Актуальность

В идеале лекарство должно приносить пользу и избирательно воздействовать на определенный патологический процесс, не оказывая при этом повреждающего действия на интактные биохимические структуры. Однако большинство лекарственных препаратов, наполняющих современный фармацевтический рынок, не соответствуют идеальному представлению о лекарстве. Являясь чужеродными для организма веществами (ксенобиотиками), они активно вмешиваются в течение нормальных процессов организма, извращая их и индуцируя развитие патологических процессов, протекающих по различным механизмам, обусловленным структурой и концентрацией того или иного токсиканта. Различные чужеродные вещества, попадая в организм через ЖКТ или с вдыхаемым воздухом, могут в зависимости от их физико-химических свойств на определенный срок аккумулироваться в различных органах. В организме ксенобиотики подвергаются дезинтоксикации путем биотрансформации. Выведение чужеродных веществ и их метаболитов из организма происходит в основном с желчью или с мочой. Следовательно, на сегодняшний день появление новых лекарственных препаратов не только открывает новые возможности для лечения пациентов, но также усложняет для врача выбор адекватной лекарственной терапии в связи с развитием нежелательных реакций и осложнений. Поэтому, в современной медицине актуально не только провести точную диагностику того или иного заболевания, но и необходимо грамотно подобрать терапевтическое лечение с учётом индивидуальных особенностей пациента.

Цель

Знакомство с методами определения продуктов биотрансформации лекарственных веществ.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Основные пути проникновения лекарственных веществ и ксенобиотиков в организм. Механизмы всасывания и транспорта ксенобиотиков через биологические мембраны. Распределение, депонирование (кумуляция) и экскреция лекарственных веществ. Биотрансформация лекарственных веществ в организме: реакции модификации и конъюгации. Схема действия ферментов микросомального окисления. Роль цитохрома P450, механизм функционирования. Изменение биологической активности лекарственных веществ в процессе

биотрансформации (усиление активности, дезактивация, модификация, появление токсических свойств). Основы химического канцерогенеза. Представление о некоторых химических канцерогенах: полициклические ароматические углеводороды, ароматические амины, диоксиды, микотоксины, нитрозамины. Роль свободнорадикального окисления и перекисного окисления липидов в метаболизме. Токсичность кислорода: образование активных форм кислорода (супероксид анион, перекись водорода, гидроксильный радикал), Повреждение мембран в результате перекисного окисления липидов. Системы защиты от токсического действия кислорода: неферментативные – витамины Е, С, глутатион; ферментативные – супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза. Зависимость биотрансформации лекарственных веществ от физиологических (пол, возраст, диета), патологических (заболевания печени, почек) и генетических факторов.

Вопросы для самоконтроля

1. Какие вещества называются ксенобиотиками?
2. Пути поступления ксенобиотиков в организм человека.
3. Этапы превращения лекарственных веществ (фармакокинетика) при энтеральном введении.
4. Превращение лекарств в ЖКТ, влияние рН среды, ферментов и др. факторов.
5. Транспорт лекарственных веществ в крови, связывание с белками крови.
6. Распределение и фиксация лекарственных веществ в органах и тканях.
7. Назвать виды транспорта веществ через мембраны клеток.
8. Механизмы обезвреживания ксенобиотиков в органах и тканях, фазы биотрансформации, их значение.
9. Какой процесс называют микросомальным окислением? Микросомальные оксидазы, их взаимосвязь с внемитохондриальными цепями переноса электронов.
10. Строение и функционирование цитохрома Р450.
11. Примеры модификации ксенобиотиков в первой фазе обезвреживания.
12. Примеры модификации основного фармакологического эффекта лекарств.
13. Примеры реакций конъюгации, указать их биологическое значение.
14. Экскреция лекарственных веществ и продуктов их биотрансформации.
15. Индивидуальная вариабельность биотрансформации лекарств, привести примеры.
16. Назвать биохимические аспекты повышения биодоступности лекарственных препаратов.
17. Липосомы и другие формы носителей лекарств.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Лабораторная работа

Определение ПАСК в моче экспресс-методом с применением бумаги «Биофанпас»

ПАСК (парааминосалициловая кислота) – противотуберкулезный препарат. По туберкулостатической активности ПАСК уступает изониазиду и стрептомицину, поэтому назначается 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, проверяя таким образом, 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 NaNO_2 , в результате которой появляется желтое окрашивание.

Проведение анализа

Полоску смочить исследуемой жидкостью (моча) и через 30 с 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.

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

Задача № 1

При совместном применении ацетилсалициловой кислоты и ряда препаратов (фенитоин, ацетаминофен, кофеин) у пациента развились побочные эффекты.

Объяснить возможные причины развития побочных эффектов.

Задача № 2

Противопоказанием к применению фенитоина – противосудорожного препарата – являются нарушения функции печени и почек, тогда как для применения фенобарбитала таких противопоказаний нет.

Объяснить причину.

Задача № 3

При повышении уровня свободных жирных кислот в сыворотке крови наблюдается существенное нарушение связывания с белками сыворотки крови салициловой кислоты, дикумарола, фенилбутазона.

Объяснить причину.

Задача № 4

При терапии инсулинзависимого сахарного диабета препараты инсулина применяют только в виде подкожных, внутримышечных или внутривенных инъекций.

Объяснить причину.

Задача № 5

Неспецифическая монооксигеназа (цитохром P450) микросомальной системы окисления катализирует не только реакции гидроксилирования, но также и реакции дезаминирования, деалкилирования, эпоксидации, сульфоокисления и др.

Объяснить причину.

ЭТАЛОНЫ ОТВЕТОВ К ТЕСТОВЫМ ЗАДАНИЯМ

РАЗДЕЛ 1. «Строение, свойства и функции белков»

Номер задания	Номер ответа	Номер задания	Номер ответа
1	2)	10	2)
2	2)	11	2)
3	3), 4), 5)	12	3), 4), 5)
4	1), 3), 4)	13	1), 2)
5	2), 3), 5)	14	1)
6	2), 4)	15	2)
7	2), 4)	16	2)
8	2), 4), 6)	17	3)
9	3)	19	3)

РАЗДЕЛ 2. «Витамины»

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

РАЗДЕЛ 3. «Ферменты»

Номер задания	Номер ответа	Номер задания	Номер ответа
1	4)	10	1)
2	3)	11	2)
3	1)	12	3)
4	3)	13	2)
5	5)	14	3)
6	3)	15	3)
7	2)	16	3)
8	3)	17	3)
9	1)		

РАЗДЕЛ 4. «Нуклеиновые кислоты»

Номер задания	Номер ответа	Номер задания	Номер ответа
1	1), 4)	8	1)
2	1), 3), 4)	9	4)
3	1), 2), 4)	10	3)
4	4)	11	2)
5	1), 5)	12	2), 3), 4)
6	2), 3), 5)	13	4)
7	2), 3), 4)	14	3)

РАЗДЕЛ 5. «Виды переноса генетической информации»

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

РАЗДЕЛ 6. «Иммунобиохимия»

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

РАЗДЕЛ 7. «Биологические мембраны»

Номер задания	Номер ответа	Номер задания	Номер ответа
1	3)	4	3)
2	2)	5	1)
3	3)		

РАЗДЕЛ 8. «Введение в обмен веществ и энергии»

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

РАЗДЕЛ 9. «Обмен функции углеводов»

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

РАЗДЕЛ 10. «Обмен и функции липидов»

Номер задания	Номер ответа	Номер задания	Номер ответа
1	2), 3)	9	2)
2	1), 2), 3)	10	3)
3	1), 2), 4)	11	1)
4	5)	12	2)
5	3)	13	2), 3), 4)
6	1), 4)	14	3)
7	1), 3), 4)	15	1), 2), 3)
8	1)	16	4)

РАЗДЕЛ 11. «Обмен белков»

Номер задания	Номер ответа	Номер задания	Номер ответа
1	3)	8	2)
2	2)	9	2), 4)
3	1)	10	3), 5)
4	2)	11	3)
5	3)	12	2)
6	1), 3), 4)	13	2)
7	3)		

РАЗДЕЛ 12. «Гормональная регуляция обмена веществ»

Номер задания	Номер ответа	Номер задания	Номер ответа
1	4), 5)	10	4)
2	1), 2), 4)	11	3), 5)
3	2)	12	3)
4	2), 3)	13	2), 4)
5	3)	14	4)
6	1), 2)	15	1)
7	4)	16	1)
8	1), 2)	17	3)
9	1), 2), 3)	18	1)

ЭТАЛОНЫ ОТВЕТОВ К СИТУАЦИОННЫМ ЗАДАЧАМ

Раздел 2. «Строение, классификация и роль витаминов»

1. Следует предполагать, что варфарин препятствует действию витамина К. Биологическая функция витамина К связана с его участием в активации факторов свертывания крови, таких как протромбин, проконвертин, фактор Кристмаса, фактор Стюарта. Поэтому основным проявлением авитаминоза К является сильное кровотечение, часто приводящее к шоку и гибели организма.
2. Жирорастворимые витамины всасываются и усваиваются организмом при участии липидов. Поэтому нарушение переваривания липидов может явиться причиной развития авитаминозов витаминов жирорастворимой группы.
3. Подкожные кровоизлияния, кровь в кале, носовые кровотечения являются характерными признаками авитаминоза витамина К, биологическая роль которого связана с участием в процессе свертывания крови. В медицинской практике при кровоточивости или кровотечениях, связанных с понижением свертывания крови, используют препараты витамина К и его синтетический аналог – викасол.
4. Такие симптомы наблюдаются при передозировке витамина Д. Суточная потребность в витамине Д составляет 0,012–0,025 мг.
5. 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.
6. 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-ретиналь) 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 трансретиналя и опсина. В темноте (ночное видение) обусловлено регенерацией родопсина из опсина и 11-цис-ретиналя. Отсутствие регенерации родопсина приводит к слепоте в сумерках.
7. 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 использо-

вать их для синтеза нуклеотидов нуклеиновых кислот и при отсутствии фолиевой кислоты.

8. 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. Таким образом, биотин хотя и содержится в пищевых продуктах, но не подвергается всасыванию.
9. Источником пищевого ниацина (витамина РР) являются мясные, особенно печень, и многие растительные продукты. Однако в отличие от других витаминов ниацин может синтезироваться в тканях организма из триптофана.
10. 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.
11. Обкладочными клетками желудка синтезируется фактор Касла, в соединении с которым осуществляется всасывание витамина В₁₂. Нарушение процесса всасывания ведет к развитию гипо- и авитаминоза, в результате развивается анемия. Следует рекомендовать лекарственные препараты витамина В₁₂.
12. Витамин РР может синтезироваться в тканях организма из триптофана. Из 60 молекул триптофана образуется 1 молекула никотинамида.
13. Развитие эпилептиформных припадков, является характерным признаком пиридоксиновой недостаточности (витамина В₆). Повышенная возбудимость центральной нервной системы и периодические судороги связаны с недостаточным образованием гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), являющейся тормозным медиатором нейронов мозга. Изониазид – антагонист витамина В₆.
14. В печени витамин Д₃ гидроксيليруется 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 – результат нарушения процесса кальцификации костной ткани вследствие недостаточной выработки кальцитриола при хроническом заболевании печени.

Раздел 9. «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 то-

- гда в моче появится глюкоза. Употребление большого количества сахара не件зно.
2. После употребления хлеба в пищу быстрого и значительного повышения глюкозы в крови не наблюдается, так как 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 развиться 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 5000 м лучше, чем на 100-метровой, ткани обеспечиваются кислородом за счет увеличения скорости объема кровотока. Кислородная задолженность организма меньше, поэтому активированы аэробные процессы обмена, уровень молочной кислоты в крови и тканях ниже, чем у спортсмена, пробежавшего 100 м.
 7. Существенного снижения уровня глюкозы в крови при кратковременном голодании не происходит, так как активизируется синтез глюкозы из аминокислот. Стабильность уровня глюкозы в крови – важный параметр гомеостаза, так как 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 («сахар-

ную 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, так как 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.

Раздел 10. «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, для 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 pH 5,0, у взрослого человека pH 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 гиперлипидемии 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 симпатoadренальной 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 ограничить жиры 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- β -липопротеинемия – тип IV. Она характерна для диабета, ожирения, ИБС.

Раздел 11. «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 связано 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 α -кетоглутарата с аммиаком синтезируется глутамат, который, связывая аммиак, образует нетоксичный глутамин. Эти реакции являются первичными, если не единствен-

ным путем детоксикации аммиака в мозге. Интенсивное их осуществление может нарушить течение ЦТК и энергообеспечение клеток мозга. Снижение уровня АТФ ведет к нарушению функции клеток мозга.

Раздел 12. «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, гипергликемия 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 характерны для гипofункции 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 больного 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 гипогликемической коме. Необходимо внутривенно ввести глюкозу.

Раздел 13. «Биохимия крови»

1. Недостаток питания, т. е. поступления в организм необходимых аминокислот и других веществ, нарушает синтез белка. При анализе крови будут отмечены гипопроteinемия, 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 весенне-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 в сыворотке крови появляются специфические «миеломные белки». Они могут преодолевать почечный барьер и появляются в моче. Их называют «белковые тела Бенс-Джонса».
6. С-реактивным 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 кетонных 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.

Раздел 14. «Биохимия почек»

1. Моча А – цвет обычный; Б – ярко-желтый цвет обусловлен присутствием значительного количества витамина В₂, принятого в поливитаминном комплексе; В – «цвет пива» обычно имеет моча, содержащая билирубин, необходим 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 содержатся креатинин и креатин, тогда как у взрослого – только креатинин.
4. Содержание креатинина в моче возрастает при заболевании мышечной и эндокринной систем, 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.

Раздел 15. «Фармацевтическая биохимия»

1. Альбумины – транспортные белки, которые переносят эндогенные (жирные кислоты, билирубин) и экзогенные (лекарственные вещества) субстраты. Лиганды конкурируют за места связывания с альбуминами. При этом с белком будет связываться тот лиганд, концентрация которого выше. У первого больного выше концентрация эндогенного субстрата, который будет в большей степени связываться с альбуминами и, соответственно, выше концентрация свободного фенитоина. Поэтому у первого пациента больше вероятность развития побочных эффектов.
2. Изменение концентрации белка крови влияет на концентрацию свободного препарата и развитие побочных эффектов тем больше, чем выше степень связывания препарата с белком. Причиной снижения белка в крови является уменьшение его синтеза при заболеваниях печени или потеря его через гломерулы при заболеваниях почек. Противопоказаниями к применению фенитоина являются нарушения функций печени и почек, так как этот препарат в большей степени связывается с белками крови (70–90 %).
3. Жирные кислоты – эндогенный лиганд для альбумина, который также является транспортным белком для многих лекарственных веществ. При повышении концентрации жирных кислот в крови они вытесняют лекарственные препараты из комплекса с альбуминами.
4. Инсулин является гормоном белковой природы, поэтому пероральное его введение недопустимо, так как инсулин будет разрушаться до

аминокислот под действием пищеварительных ферментов желудка и поджелудочной железы.

5. Неспецифическая монооксигеназа (цитохром P450) представляет собой суперсемейство (состоит из 4 семейств), биохимической функцией которого является образование полярных соединений из неполярных. Субстраты (в настоящее время насчитывается около 7000), окисляемые цитохромом P450, должны отвечать одному требованию – быть неполярными. Наличие большого количества изоферментов позволяет катализировать различные реакции, основным результатом которых является повышение растворимости ксенобиотиков, что облегчает их дальнейшее выведение из организма.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

ОСНОВНАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Биохимия / под ред. Северина Е.С. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. – 768 с.
2. Нельсон Д. Основы биохимии Ленинджера: В 3 т. Т.1: Основы биохимии. Строение и катализ / Д. Нельсон, М. Кокс; пер с англ.– М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – 694 с.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Клиническая лабораторная диагностика. Интерпретация результатов лабораторных исследований: учебное пособие / под ред. Н. В. Канской. – Томск: СибГМУ, Ацтек, 2015. – 144 с.
2. Солвей, Дж. Г. Наглядная медицинская биохимия: учебн. пособие / Дж. Г.Солвей; пер. с англ. А.П. Вабищевич, О.Г. Терещенко; под ред. Е. С. Северина. – 3-е изд, перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 168 с.

ИЛЛЮСТРАЦИИ

Рис. 1. Материал с сайта: <http://baikallab.ru>

Рис. 3. Материал с сайта: <http://booktech.ru>

Рис. 4. Материал с сайта: <http://www.baigish.ru>

Рис. 5. Материал с сайта: <http://www.pikon.ru/uni.html>

Учебно-практическое издание

Авторы:

ПОЗДНЯКОВА Ирина Анатольевна
ИВАНОВ Владимир Владимирович
КАНСКАЯ Наталья Викторовна
ТИМИН Олег Алексеевич
АКБАШЕВА Ольга Евгеньевна

**ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ
ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ**

Учебное пособие для студентов фармацевтического факультета

2-е издание, переработанное и дополненное

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

Редактор И.А. Зеленская
Технический редактор И.Г. Забоенкова
Обложка И.Г. Забоенкова

Издательство СибГМУ
634050, г. Томск, пр. Ленина, 107
тел. 8(3822) 51-41-53
E-mail: otd.redaktor@ssmu.ru

Подписано в печать 13.12.2016 г.

Формат 60x84 $\frac{1}{16}$. Бумага офсетная.

Печать ризограф. Гарнитура «Times». Печ. л. 14,3, авт. л. 1,23

Тираж 100 экз. Заказ №

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