

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

Т.В. Жаворонок, О.А. Тимин

**Практикум
по биологической химии
и
биохимии полости рта**

Томск
Издательство СибГМУ
2016

УДК 577.1:612.31015(075)](075.8)
ББК 28.707.2я73
Ж135

Авторы:

Т. В. Жаворонок, О. А. Тимин

Ж 135 Жаворонок Т. В. **Практикум по биологической химии и биохимии полости рта**
/ Т. В. Жаворонок, О. А. Тимин. – Томск: СибГМУ, 2016. – 232 с.

Практикум подготовлен в рамках дисциплины «Биологическая химия – биохимия полости рта» в соответствии с Федеральным государственным образовательным стандартом высшего образования и предназначен для студентов, обучающихся по основной профессиональной образовательной программе высшего образования – программе специалитета по специальности «Стоматология».

Практикум нацелен на освоение наиболее важных разделов биологической химии с акцентированием внимания на основах биохимии полости рта и отдельных аспектах клинической биохимии, необходимых для понимания будущими врачами-стоматологами метаболизма человека в норме и при патологических сдвигах, приводящих к развитию заболеваний полости рта и организма в целом. Практикум включает как традиционные, так и современные методы лабораторных исследований важнейших химических компонентов организма и контрольные материалы.

УДК 577.1:612.31015(075)](075.8)
ББК 28.707.2я73

Рецензент:

Д.И. Кузьменко – доктор медицинских наук, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики Сибирского государственного медицинского университета.

Практикум утвержден и рекомендован к печати Центральным методическим советом ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (протокол № 3 от 06.04.2016 г.)

© Т.В. Жаворонок, О.А.Тимин, 2016
© Издательство СибГМУ, 2016

ВВЕДЕНИЕ

Разработка данного издания преследует цель адаптации учебного процесса к новым требованиям доказательной медицины, которые базируются на развитии научных представлений о метаболизме организма человека, усовершенствовании методологии диагностики заболеваний, широком внедрении в клиническую лабораторную практику современных методов. Актуальность практикума при обучении будущих врачей-стоматологов определена необходимостью закрепления теоретического курса биохимии, изучения эффективных подходов к оценке обмена веществ в полости рта и организме в целом, получения целостного представления о востребованных на современном этапе методах лабораторной диагностики и приобретения основ практических навыков по предмету.

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

В предлагаемом практикуме обоснованы актуальность и цели каждой темы (одно или несколько занятий), приведены вопросы для самостоятельной подготовки, руководство по лабораторным работам с указанием практического или клинико-диагностического значения изучаемых показателей. В ряде случаев поставлены вопросы, ответ на которые позволяет студенту правильно оформить протокол исследования и понять диагностическое значение работы.

Преподавание биологической химии, особенно с аспектами клинической биохимии, требует от студента умения не только грамотно провести анализ, но и осознать клиническую значимость результатов. Поэтому в настоящее издание включены работы, проводимые в русле поискового исследования, когда студент выбирает нужный вариант анализа в зависимости от итогов предшествующего этапа. В практикуме присутствует блок практических работ, которые позволяют углубить теоретические знания по биохимии полости рта и оценить нарушения метаболизма, приводящие к развитию патологии стоматологического профиля. В рамках этого блока сделан акцент на актуальную методологию и предоставлена возможность ознакомиться с современным комплексным подходом к ИФА-диагностике, ПЦР-анализу.

В практикуме присутствуют задания по составлению ряда схем и таблиц, нацеленные на углубление знаний по ключевым вопросам биохимии (обмен аминокислот, углеводов, липидов, энергетический обмен, эндокринная регуляция) и предполагающие работу над ними по мере изучения материала. Предложены тесты и ситуационные задачи для самоконтроля полученных знаний, вопросы к итоговым занятиям и семинарам по наиболее сложным темам, перечень экзаменационных вопросов. Все это поможет студентам всесторонне осмыслить изучаемый материал и получить глубокие знания по предмету.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ	– аденозиндифосфат
АлАТ	– аланинаминотрансфераза
АМФ	– аденозинмонофосфат
АсАТ	– аспартатаминотрансфераза
АТФ	– аденозинтрифосфат
ГАМК	– гаммааминомасляная кислота
ГАП	– гидроксиапатит
ГМФ	– гуанозинмонофосфат
ГТТ	– глюкозотолерантный тест
ГТФ	– гуанозинтрифосфат
ДАГ	– диацилглицерол
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНП	– дезоксирибонуклеопротеины
ДНФГ	– динитрофенилгидразин
ДХГБС	– дихлоргидроксибензолсульфонат натрия
ДХФИФ	– дихлорфенолиндифенол
ЖКТ	– желудочно-кишечный тракт
ИМФ	– инозинмонофосфат
ИФ ₃	– инозитолтрифосфат
ИФА	– иммуноферментный анализ
КоА	– коэнзим А
КОС	– кислотно-основное состояние
ЛПНП	– липопротеины низкой плотности
ЛПВП	– липопротеины высокой плотности
ЛПОНП	– липопротеины очень низкой плотности
ЛХАТ	– лецитинхолестеролацилтрансфераза
МАГ	– моноацилглицерол
НАД+	– никотинамидадениндинуклеотид
НАДН	– никотинамидадениндинуклеотид восстановленный
НАДФ+	– никотинамидадениндинуклеотид фосфат
НАДФН	– никотинамидадениндинуклеотид фосфат восстановленный
ПАЛФ	– пиридоксальфосфат
ПДААБ	– пара-диметиламиноазобензол
ПОЛ	– перекисное окисление липидов
ПОМК	– проопиомеланокортин
ПТГ	– паратгормон
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РНК	– рибонуклеиновая кислота
РНП	– рибонуклеопротеины
РЭС	– ретикуло-эндотелиальная система
СПИД	– синдром приобретенного иммунодефицита
ТАГ	– триацилглицеролы
ТГФК	– тетрагидрофолиевая кислота
ТМФ	– тимидинмонофосфат
ТТГ	– тест на толерантность к глюкозе
ТХУ	– трихлоруксусная кислота
УДФГК	– уридиндифосфоглюкуроновая кислота
УИРС	– учебно-исследовательская работа студентов
УМФ	– уридинмонофосфат
УТФ	– уридинтрифосфат
ФАД	– флавинадениндинуклеотид

ФАДН ₂	– флавинадениндинуклеотид восстановленный
ФАФС	– фосфоаденозинфосфосерная кислота
ФИФ ₂	– фосфатидилинозит фосфорилированный
ФМН	– флавиномононуклеотид
ХЛ	– хемилюминесценция
цАМФ	– циклический аденозинмонофосфат
цГМФ	– циклический гуанозинмонофосфат
ЦМФ	– цитозинмонофосфат
ЦНС	– центральная нервная система
ЦТАБ	– цетилтриметиламмонийбромид
ЦТК	– цикл трикарбоновых кислот, цикл Кребса
ЦТФ	– цитозинтрифосфат
ЩФ	– щелочная фосфатаза
ЭДТА	– этилендиаминтетраацетат
ВАР	– костный изофермент щелочной фосфатазы
EIA	– иммуноферментный анализ, ИФА (Enzyme Immuno Assay)
ELISA	– ферментосвязанный иммуносорбционный анализ, вариант ИФА (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay)
FAT	– тест на флуоресцирующие антитела (Fluorescent Antibody Test)
GLUT	– глюкозный транспортер (белок-переносчик)
IFA	– иммунофлуоресцентный анализ (ImmunoFluorescence Assay)
N-MID	– средний полипептидный фрагмент остеокальцина
NF-каппаВ	– ядерный фактор каппа В
OPG	– остеопротегерин
PCR	– полимеразная цепная реакция (Polymerase Chain Reaction)
PCR-assay	– ПЦР-анализ (Polymerase Chain Reaction-assay)
RANK	– рецептор активатора ядерного фактора каппа В (Receptor activator of NF-каппа В)
RANKL	– лиганд рецептора активатора ядерного фактора каппа В (Receptor Activator of NF-каппа В Ligand)
TRACP 5B	– тартрат-резистентная кислая фосфатаза

РАЗДЕЛ 1

СТРОЕНИЕ, СВОЙСТВА, ФУНКЦИИ БЕЛКОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

ТЕМА 1.1

СТРОЕНИЕ, КЛАССИФИКАЦИЯ И РОЛЬ АМИНОКИСЛОТ. СТРУКТУРА МОЛЕКУЛ БЕЛКА

Актуальность

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

Цель

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

Вопросы для самоподготовки

1. Классификации аминокислот. Понятия «протеиногенные аминокислоты» и «непротеиногенные аминокислоты».
2. Свободные аминокислоты в организме, их разнообразие и роль.
3. Основные физико-химические свойства аминокислот. Роль функциональных групп аминокислот, значение и разнообразие свойств бокового радикала.
4. Незаменимые аминокислоты. Формулы и значение.
5. Гидрофобность и гидрофильность аминокислот, изоэлектрическая точка, дополнительный отрицательный и положительный заряды при рН 7,0.
6. Пептидная связь. Строение, образование, свойства пептидной связи.
7. Построение, название пептидов, растворимость, ионизация и заряд при рН 7,0, движение в электрическом поле. Изоэлектрическая точка и факторы, влияющие на неё.
8. Понятие белка, элементарный состав, роль в организме. Организация белковой молекулы, характеристика и биологический смысл появления уровней организации.
9. Обнаружение аминокислот и белка, удаление белка из биожидкостей.

Самостоятельная работа

Заполнить графы 1,2,3,4 таблицы протеиногенных аминокислот (Приложение 1).
Структурные формулы аминокислот писать и запоминать в виде



Лабораторная работа 1

Цветные реакции на белки и аминокислоты

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

Реактивы

1) 0,5 % раствор нингидрина, 2) 10 % и 30 % растворы NaOH, 3) 1 % раствор CuSO₄, 4) 5 % раствор Pb(CH₃COO)₂, 5) 5 % раствор нитропруссиды Na, 6) реактив Миллона, 7) конц. H₂SO₄, 8) конц. HNO₃.

Материал для исследования

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

Ход работы

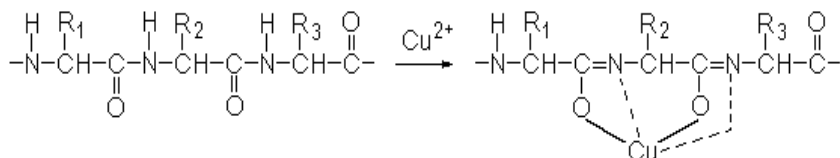
В пронумерованные пробирки наливают по 5 капель исследуемой жидкости. Руководствуясь приведёнными ниже указаниями, проделывают цветные реакции, наблюдают результаты и записывают выводы в таблицу.

БИУРЕТОВАЯ РЕАКЦИЯ

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

Принцип реакции

Пептидные группы образуют в щелочной среде с ионами Cu²⁺ комплексное соединение фиолетового цвета с красным или синим оттенком в зависимости от числа пептидных связей и состава аминокислот. Интенсивность окрашивания пропорциональна количеству пептидных групп.



Проведение анализа

В пробирку с исследуемой жидкостью вносят 3 капли 10 % NaOH и 1 каплю 1 % CuSO₄.

НИНГИДРИНОВАЯ РЕАКЦИЯ

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

Принцип метода

α-Аминогруппа аминокислот, взаимодействуя с нингидрином, образует комплексное соединение синего или сине-фиолетового цвета: при нагревании аминокислот с нингидрином происходит окислительное дезаминирование α-аминогрупп и восстановление нингидрина, который реагирует с аммиаком и другой молекулой окисленного нингидрина с образованием окрашенного продукта. Иминокислоты (пролин и оксипролин) дают продукт желтого цвета.

Проведение анализа

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

КСАНТОПРОТЕИНОВАЯ РЕАКЦИЯ

Выявляет наличие ароматических аминокислот (фенилаланин, тирозин, триптофан).

Принцип метода

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

Проведение анализа

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

РЕАКЦИЯ ФОЛЯ

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

Принцип метода

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

Проведение анализа

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

Практическое значение

Реакции на аминокислоты и белок могут быть полезны при изучении состава веществ, установлении белковой природы веществ и оценке количества белка. Цветные реакции используют в биохимических исследованиях и в клиничко-биохимических лабораториях для обнаружения белка и аминокислот и оценки содержания белка в биологических жидкостях, в фармацевтической практике для качественного анализа белковых лекарственных средств. В медицине, фармации, косметологии, биологии широкое применение нашли аминокислотные гидролизаты, получаемые при промышленном гидролизе белков и содержащие полный набор заменимых и незаменимых аминокислот.

Оформление работы

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

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

Лабораторная работа 2

Исследование наличия белка и свободных аминокислот в биологическом материале

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

Материал для исследования

Сыворотка крови, моча, слюна (прополаскивают полость рта 1-2 мин с 50 мл дист. воды для удаления остатков пищи, собирают слюну в стаканчик/пробирку, избегая пенообразования).

Реактивы

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

Проведение анализа

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

Дальнейшие действия зависят от наличия или отсутствия белка в пробах:

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

Практическое значение

Состав биологических жидкостей в ходе формирования патологии изменяется, что выявляют при диагностике заболеваний и контроле лечения. Многие методы оценки метаболитов углеводного, липидного и других обменов требуют отсутствия белков в биожидкости, поэтому их удаляют до анализа путем осаждения и последующей фильтрации/центрифугирования.

Цветные реакции на белок и аминокислоты используют в биохимических исследованиях для контроля полноты удаления белка из жидкости и оценки наличия белка и аминокислот в биологических средах, в фармации для качественного анализа белковых лекарственных средств.

Оформление работы

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

Объект исследования	Обнаруженные соединения	
	Белок	Свободные аминокислоты
Сыворотка крови		
Слюна		
Моча		

Вопросы для самоконтроля

1. Понятия «аминокислота», «пептид», «белок».
2. Элементарный состав и функции белков в организме.
3. Строение всех протеиногенных аминокислот, основные физико-химические свойства аминокислот. Роль функциональных групп.
4. Классификации аминокислот по биологической роли, строению радикала, физико-химическим свойствам, растворимости в воде. Незаменимые аминокислоты. Непротеиногенные аминокислоты.
5. Реакция образования пептидной связи, лежащей в основе построения первичной структуры белковой молекулы. Свойства пептидной связи. Построение пептида, название, заряд, движение в электрическом поле при разных значениях pH среды.
6. Уровни организации молекул белка, стабилизирующие связи. Биологический смысл появления различных уровней в структуре белка.
7. Особенности аминокислотного состава и структурной организации молекул коллагена.

ТЕМА 1.2

СОСТАВ И СВОЙСТВА БЕЛКОВ. МЕТОДЫ ОЧИСТКИ И ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛКОВ

Актуальность

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

Цель

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

Вопросы для самоподготовки

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

Темы для реферативных сообщений

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

Лабораторная работа 1

Высаливание белков

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

Реактивы

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

Материалы для исследования

Сыворотка крови, раствор яичного белка.

Принцип

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

Проведение анализа

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

К 20 каплям яичного белка (или сыворотки крови) добавляют равный объем насыщенного раствора сульфата аммония и получают полунасыщенный раствор, в котором выпадает осадок яичного глобулина (или глобулинов крови). Через 5 мин осадок отделяют фильтрованием с помощью стеклянной воронки с бумажным фильтром. Наличие белка на фильтре доказывают биуретовой реакцией, используя для защелачивания среды 10 % NaOH, для цветной реакции 1 % CuSO_4 .

Часть прозрачного фильтрата отбирают пипеткой в чистую пробирку для проведения биуретовой реакции - наличие альбуминов доказывают, добавляя растворы 10 % NaOH и 1 % CuSO_4 .

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

Оформление работы

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

Практическое значение

Метод использовался в прошлом в клинических лабораториях для разделения альбуминов и глобулинов, определения их соотношения в сыворотке крови. В норме соотношение альбумин/глобулин в сыворотке крови человека колеблется в пределах 1,5-2,3 и изменяется при патологии: например, при воспалительных заболеваниях увеличивается содержание глобулинов и снижается концентрация альбуминов.

Лабораторная работа 2.

Исследование денатурации белков

Денатурацией называют изменение структурной организации белковой молекулы (чаще третичной, четвертичной и даже вторичной структуры), приводящее к изменению физико-химических и биологических свойств белка. Обратимой денатурация может быть только при сохранении первичной структуры белка и возврате молекулы в оптимальные для нее или близкие к таковым условия. Денатурирующие факторы подразделяют на химические (минеральные и органические кислоты, щелочи, тяжелые металлы и др.), физические (ультразвук, высокая температура, радиация и др.) и факторы биологического характера (протеолитические ферменты – трипсин, пепсин и др.). Большинство химических агентов вызывает необратимую денатурацию белков, несмотря на существенные различия в механизмах воздействия.

Реактивы

1) 20 % раствор сульфосалициловой кислоты, 2) 10 % раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ), 3) конц. HNO_3 , 4) конц. H_2SO_4 , 5) 1% раствор CuSO_4 , 6) 5 % раствор $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$,

7) танин, 8) ацетон, 9) этанол, 10) 1 % и 10 % растворы CH_3COOH , 11) насыщенный раствор NaCl , 12) 10 % раствор NaOH .

Материалы для исследования

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

*ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕНАТУРАЦИИ БЕЛКОВ
ПРИ НАГРЕВАНИИ В РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ*

Принцип

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

Проведение анализа

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

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

Оформление работы

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

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

ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОЙ ДЕНАТУРАЦИИ БЕЛКОВ

Проведение анализа

Берут 2 ряда пробирок, помещая каждый ряд в отдельный штатив и нумеруя от 1 до 11. В 1-й ряд пронумерованных пробирок вносят по 5 капель 1 % раствора яичного белка, во 2-й ряд - по 5 капель сыворотки крови. В каждый ряд пробирок добавляют реактивы, пользуясь указаниями приведённой ниже таблицы. После проведения всех реакций оценивают результаты, сравнивают изменения в соседних пробирках. Затем для установления необратимо-

сти/обратимости осаждения белка, во все пробирки к осадку добавляют 10-20 капель дистиллированной воды. Оценивают результаты, сравнивают с изменениями в соседних пробирках.

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

Практическое значение

Реакции химической денатурации используют для осаждения белка в биоматериале с целью дальнейшего определения в надосадке низкомолекулярных веществ (чаще всего веществ углеводной и липидной природы); выявления или оценки содержания белка в биологических жидкостях; связывания солей тяжелых металлов при лечении отравлений и для профилактики их на производстве; обезвреживания отходов в санитарной практике; дезинфекции кожи, слизистых покровов.

Оформление работы

Регистрируют результаты работы в таблице, оценивая интенсивность денатурации белков по выпадающему осадку: – отсутствие; + слабая; ++ сильная; +++ очень сильная. В конце таблицы делают общий вывод по химической денатурации белка, особенностям действия отдельных денатурирующих агентов и обратимости химической денатурации белков.

Вопросы для самоконтроля

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

ТЕМА 1.3

КЛАССИФИКАЦИЯ, ФУНКЦИИ БЕЛКОВ. ПРОСТЫЕ И СЛОЖНЫЕ БЕЛКИ

Актуальность

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

Цель

1. Научиться выделять сложные белки из различных объектов и проводить качественные реакции на компоненты сложных белков.
2. Изучить структуру и свойства сложных белков: фосфопротеинов, гликопротеинов, флавопротеинов и других.

Вопросы для самоподготовки

1. Строение протеиногенных аминокислот, свойства боковых радикалов аминокислот в составе молекулы белков, взаимодействие с небелковой частью.
2. Классификация белков по функциональным признакам, основные представители классов.
3. Классификации белков по строению.
4. Простые белки. Характеристика, особенности строения и функции классов простых белков (протамины, гистоны, альбумины, глобулины и др.).
5. Общая характеристика, особенности строения сложных белков.
6. Фосфопротеины: строение и узел связи с небелковой частью, функции.
7. Хромопротеины. Разнообразие небелковой части (гемо-, флаво-, ретинальпротеины и др.), функции, основные представители. Понятие о строении витаминов В₂, А, гема, гемоглобина и миоглобина.
8. Металлопротеины: понятие о строении и связях, основные представители, роль в транспорте и депонировании металлов, металлоферменты.
9. Гликопротеины: строение, связь с небелковым компонентом, состав углеводного компонента, функции в организме. Сходство и различия гликопротеинов и протеогликанов.
10. Протеогликаны: функции, представление о строении простетической группы (углеводный кор, пример его построения и связи с белком, участие гликозиламиногликанов – хондроитинсульфатов и др.).
11. Липопротеины. Понятие о строении, связях липопротеинов мембран. Структура транспортных липопротеинов, функции апобелков. Основные транспортные формы липидов плазмы – хиломикроны, липопротеины очень низкой, низкой и высокой плотности (ЛПОНП, ЛПНП и ЛПВП).
12. Понятие о надмолекулярных комплексах и их построении – на примере протеогликанов и транспортных липопротеинов.

Темы для реферативных сообщений

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

Лабораторная работа 1

Выделение и анализ составных компонентов фосфопротеинов и гликопротеинов

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

Реактивы

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

АНАЛИЗ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ФОСФОПРОТЕИНОВ

Материал для исследования

Молоко.

Проведение анализа

К 2,0 мл молока приливают 2,0 мл дист. воды, перемешивают. Добавляют для подкисления 2 капли конц. CH₃COOH (при pH 4,7 молоко свертывается, в осадок выпадает белок казеиноген). Полученный хлопьевидный осадок белка отфильтровывают на воронке с бумажным фильтром. Осадок на фильтре делят на 2 части: с 1-ой проводят качественную реакцию на белок, 2-ую переносят в пробирку и определяют наличие фосфорной кислоты в казеиногене.

1) Молибденовая проба на фосфорную кислоту

Принцип

Фосфорная кислота реагирует с молибденовокислым аммонием в азотной кислоте, образуя комплекс аммония фосфомолибдата лимонно-желтого цвета.

Проведение реакции

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

2) Биуретовая реакция на белок

Принцип

Пептидная группа образует в щелочной среде с ионами Cu²⁺ комплексное соединение фиолетового цвета с красным или синим оттенком в зависимости от числа пептидных связей (не менее 2-х) и состава аминокислот.

Проведение реакции

К оставшейся на фильтре части осадка добавляют 10 капель 10 % раствора NaOH для защелачивания и 1 каплю 1 % раствора CuSO₄, развивается характерная окраска.

АНАЛИЗ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ГЛИКОПРОТЕИНОВ

Материал для исследования

Слюна.

Проведение анализа

В 2 мерные центрифужные пробирки собирают по 1 мл слюны, по каплям медленно приливают конц. CH₃COOH до появления сгустка муцина. Проводят реакции на обнаружение компонентов гликопротеинов: в 1-ой пробирке – углеводного, во 2-ой пробирке – белкового.

1) Реакция Молиша на углеводные группы

Принцип

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

Проведение реакции

Из 1-ой пробирки жидкость аккуратно сливают, к ступку муцина добавляют 2–3 капли раствора тимола, перемешивают. Осторожно по стенке добавляют конц. H_2SO_4 и, не перемешивая, оставляют пробирку на несколько минут для развития характерной окраски на границе раздела серной кислоты и жидкой части пробы.

2) Биуретовая реакция на белок

Принцип

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

Проведение реакции

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

Оформление работы

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

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

Лабораторная работа 2

Обнаружение небелкового компонента гемопротеинов в биологических пробах

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

Принцип

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

Реактивы

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

Материалы для исследования

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

Проведение анализа

В 1-ю пробирку помещают 0,5 мл дистиллированной воды. Берут из пальца 2 капли крови (место взятия предварительно обрабатывают ватным тампоном, смоченным этанолом) и до-

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

Практическое значение

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

Оформление работы

Отмечают принцип метода, регистрируют результаты и делают вывод.

Вопросы для самоконтроля

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

ТЕМА 1.4

НУКЛЕОТИДЫ, НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ, НУКЛЕОПРОТЕИНЫ: СТРУКТУРА, СВОЙСТВА, ФУНКЦИИ

Актуальность

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

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

Цель

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

Вопросы для самоподготовки

1. Строение, связи, биологическая роль пуриновых, пиримидиновых нуклеотидов, важнейших моно-, ди-, циклонуклеотидов, нуклеозидтрифосфатов.
2. Нуклеотидные кофакторы, представление об их получении в организме, направлениях использования.
3. Виды нуклеиновых кислот, их сходство и различия, локализация в клетке, биологические функции, полианионный потенциал и его нейтрализация.
4. Состав ДНК, уровни организации и стабилизирующие связи, физико-химические свойства и биологическое назначение.
5. РНК: классификация, состав и особенности строения, уровни организации и стабилизирующие связи, биологические функции. Малые РНК, рибозимы.
6. Понятие о метаболических и биологических взаимосвязях аминокислот и нуклеиновых кислот: аминокислоты - предшественники азотистых оснований нуклеотидов, нуклеиновые кислоты - предшественники белков. Формулы аминокислот - источников атомов для синтеза азотистых оснований.
7. Мочевая кислота как представитель пуринов, свойства, происхождение и роль в организме, значение в клинике (выпадение кристаллов мочевой кислоты в суставах, образование мочевых камней).
8. Строение нуклеопротеинов, значение в жизнедеятельности клетки, разнообразие структур белковой и небелковой части. Роль белков информсом и рибосом в нуклеопротеиновых комплексах.
9. Особенности аминокислотного состава и строения простых белков гистонов и протаминов, их разнообразие, локализация в клетке, биологическое значение, роль в стабилизации нуклеиновых кислот.
10. Нуклеотиды – лекарственные препараты.

Лабораторная работа 1

Обнаружение мочевой кислоты

Мочевая кислота относится к пуриновым основаниям, является продуктом окислительного катаболизма пуриновых нуклеотидов, вследствие своих структурных особенностей имеет функциональное значение в организме (проявляет антиоксидантные и другие свойства).

Принцип

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

Реактивы

1) Конц. HNO_3 , 2) конц. раствор NH_4OH , 3) 10 % раствор KOH .

Материал для исследования

Кристаллы мочевой кислоты.

Проведение анализа

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

Практическое значение

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

Оформление работы

Отмечают принцип метода, регистрируют результаты и делают вывод.

Лабораторная работа 2

Анализ химического состава нуклеопротеинов

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

Реактивы

1) 1 % раствор тимола в этаноле, 2) 10 % раствор NaOH, 3) концентрированный раствор NH₄OH (аммиак), 4) молибденово-кислый аммоний, 5) концентрированная H₂SO₄, 6) 1 % раствор CuSO₄, 7) 1 % аммиачный раствор AgNO₃.

Материал для исследования

Гидролизат дрожжей (готовят лаборанты: 1 г дрожжей кипятят 1 час с 20 мл 1 % раствора H₂SO₄ и 20 мл дистиллированной H₂O в колбе с обратным холодильником, фильтруют).

Проведение анализа

ЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ НА КОМПОНЕНТЫ НУКЛЕОПРОТЕИНОВ

1) Биуретовая реакция – на белковый компонент

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 и состава аминокислот. Интенсивность окрашивания пропорциональна количеству пептидных групп.

Проведение реакции

В пробире смешивают 5 капель гидролизата, 10 капель 10% раствора NaOH и 1 каплю 1% раствора CuSO₄.

2) Серебряная проба – на пуриновые основания

Принцип

Пуриновые основания (аденин, гуанин), взаимодействуя с AgNO₃, образуют через 5-10 мин рыхлый светло-коричневый осадок серебряных солей.

Проведение реакции

К 10 каплям гидролизата добавляют 10 капель концентрированного раствора NH₄OH и 10 капель 1 % аммиачного раствора AgNO₃. При стоянии образуется осадок характерной окраски.

3) Реакция Молиша – на углеводные группы

Принцип

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

Проведение реакции

К 10 каплям гидролизата добавляют 2-3 капли раствора тимола, перемешивают. Осторожно по стенке добавляют концентрированную H₂SO₄ и, не перемешивая, оставляют на несколько минут для лучшего развития тёмно-розовой окраски на границе раздела H₂SO₄ и жидкой части пробы.

4) Молибденовая проба – на фосфорную кислоту

Принцип

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

Проведение реакции

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

Оформление работы

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

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

Вопросы для самоконтроля

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

Тестовые задания

Выбрать один правильный ответ.

1. АБСОЛЮТНО НЕЗАМЕНИМА ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА АМИНОКИСЛОТА

- 1) глицин
- 2) валин
- 3) тирозин
- 4) серин

2. ПРИ PH 7,4 ПОЛОЖИТЕЛЬНО ЗАРЯЖЕНА АМИНОКИСЛОТА

- 1) пролин
- 2) оксипролин
- 3) аргинин
- 4) аспаргат
- 5) аспарагин

3. ПРОСТЫМ БЕЛКОМ ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) гемоглобин
- 2) соматотропин
- 3) альбумин
- 4) церулоплазмин

4. В СТАБИЛИЗАЦИИ ТРЕТИЧНОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ В ПРОСТРАНСТВЕ НЕ УЧАСТВУЮТ

- 1) электростатические взаимодействия радикалов аминокислот
- 2) водородные связи
- 3) гидрофобные взаимодействия
- 4) дисульфидные мостики
- 5) взаимодействия простетических групп
- 6) пептидные связи

5. ЦЕНТР УЗНАВАНИЯ БЕЛКА ЛИГАНДОМ ПРЕДСТАВЛЯЕТ СОБОЙ

- 1) место связывания белка и небелкового кофактора
- 2) "нишу" на поверхности белковой молекулы
- 3) гидрофильный фрагмент пептидного остова
- 4) участок белковой цепи, комплементарный лиганду

6. ПЕПТИД АСП-ЛЕЙ-ГЛУ-ГЛИ В ЭЛЕКТРИЧЕСКОМ ПОЛЕ ПРИ $pH=6,8$

- 1) движется к аноду
- 2) остается на месте
- 3) движется к катоду

7. СВОЙСТВОМ БЕЛКОВ, ИСПОЛЬЗОВАННЫМ В АППАРАТЕ "ИСКУССТВЕННАЯ ПОЧКА", ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) отсутствие способности проникать через полупроницаемые мембраны (диализ)
- 2) способность связывать полярные молекулы
- 3) создание онкотического давления
- 4) низкая скорость диффузии

8. КООПЕРАТИВНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ В МОЛЕКУЛЕ БЕЛКА ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ НА УРОВНЕ

- 1) первичной структуры
- 2) третичной структуры
- 3) альфа-спирали
- 4) четвертичной структуры
- 5) бета-складчатости

9. В СЛУЧАЕ ДЕНАТУРАЦИИ ДНК ВОЗНИКАЕТ ТАКОЕ ФИЗИЧЕСКОЕ ЯВЛЕНИЕ КАК

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

10. ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ДНК СТАБИЛИЗИРОВАНА

- 1) SS-мостиками
- 2) фосфоэфирными связями
- 3) фосфодиэфирными связями
- 4) N-гликозидными связями
- 5) O-гликозидными связями

Ситуационные задачи

1. Проведено осаждение белка из биологической жидкости, в которой создано 50%-ное насыщение сульфатом аммония. После отделения осадка жидкость стала прозрачной. *Пояснить, какие белки осаждаются в данных условиях. Указать, достигнута ли полнота осаждения белка и способ для подтверждения этого.*
2. В биохимической лаборатории исследуется электрофоретическая подвижность белков. *Указать направление движения в электрическом поле (к аноду, катоду или остаются на старте) следующих белков:*
 - а) яичный альбумин при рН 5,0 (изоэлектрическая точка рН 4,6),
 - б) β -лактоглобулин при рН 5,0 и 7,0 (изоэлектрическая точка рН 5,2),
 - в) химотрипсिनоген при рН 5,0; 9,5; 11,0 (изоэлектрическая точка рН 9,5).
3. При частичном гидролизе белка и последующем фракционировании получены два пептида:
 - а) Гли–Ала–Вал–Лей–Иле,
 - б) Тре–Асп–Лиз–Тир–Глу.

Пояснить, какое из этих соединений более похоже по свойствам на углеводород, какое лучше растворимо в неводной жироподобной среде. Указать, как каждое из этих соединений ведет себя в случае проведения биуретовой пробы, нингидриновой реакции, реакции Фоля и ксантопротеиновой реакции, какое из них более способно к участию в образовании солевых мостиков.

РАЗДЕЛ 2

СТРОЕНИЕ, СВОЙСТВА, ФУНКЦИИ ФЕРМЕНТОВ И ВИТАМИНОВ

ТЕМА 2.1

СТРОЕНИЕ, СВОЙСТВА, КЛАССИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ

Актуальность

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

Цель

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

Вопросы для самоподготовки

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

Самостоятельная работа

Задание. Рассчитать активность фермента аргиназы в 1,2 мл экстракта печени, если за 10 мин в экстракте преобразовано 100 мкмоль субстрата. Представить искомую активность фермента в международных единицах, а также с использованием единиц системы СИ. Показать

удельную активность этого фермента, если 1 мл экстракта печени содержит 50 мг белка. Для расчетов использовать приведенные теоретические предпосылки, примеры.

1. Активность ферментов определяют методами спектрофотометрии, полярографии, фотометрии, оценивая их активность по убыли субстрата или по образованию конечного продукта реакции за определенный промежуток времени.

2. Активность ферментов принято выражать в условных единицах, так как измерение абсолютных величин затрудняют ничтожно малые концентрации ферментов, сложность их выделения и идентификации.

За международную единицу активности фермента (Е) принимают такое его количество, которое способно превратить 1 мкмоль субстрата за 1 мин при 30°C и других оптимальных условиях. Концентрацию фермента в растворе выражают в Е/мл или Е/л, то есть в международных единицах в расчете на 1 мл или на 1 л. За стандартную единицу в системе СИ (катал) принимают количество фермента, превращающее субстрат со скоростью 1 моль/сек (1 катал = 60 000 000 Е).

Пример 1: если при инкубации 0,5 мл экстракта печени с раствором аргинина за 15 мин разложилось 120 мкмоль аргинина, то 0,5 мл экстракта содержит $120/15 = 8$ Е аргиназы, активность которой будет $8/0,5 = 16$ Е/мл или 16000 Е/л.

Часто активность фермента выражают в расчете не на объем раствора, а на содержание белка, и получают удельную активность фермента, которую представляют в единицах активности на 1 мг белка (Е/мг).

Пример 2: если в 0,5 мл экстракта, содержащего 8 Е аргиназы, обнаружено 20 мг белка, то удельная активность равна $8/20 = 0,4$ Е/мг.

Лабораторная работа 1

Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры

Реактивы

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

Материал для исследования

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

Принцип

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

Проведение реакции

1. В пробирки (1, 2, 3, 4) вносят по 10 капель крахмала (раствор субстрата). В следующие пробирки (5, 6, 7, 8) - по 10 капель разведенной слюны (источник α -амилазы). Пробирки делят по парам: 1-5, 2-6, 3-7, 4-8.

2. Первую пару пробирок (1 и 5) помещают в баню со льдом (0°C). Вторую пару (2 и 6) оставляют при комнатной температуре (18-22°C). Третью пару (3 и 7) помещают в водяную баню/термостат (38-40°C). Четвертую пару (4 и 8) помещают в кипящую водяную баню (100°C).

3. Через 5 мин содержимое каждой пары пробирок объединяют, приливая раствор фермента к субстрату, инкубируют ещё 5 мин (условия те же).

4. Из 3-й пробирки отбирают на предметное стекло 3 капли смеси, добавляют каплю реактива Люголя (источник йода). Появление желтой окраски указывает на завершение гидролиза

крахмала амилазой до мальтозы. В этом случае с содержимым остальных пробирок проводят ту же качественную реакцию (с каплей реактива Люголя), оценивают результат.

5. Если окраска в 3-ей пробирке осталась фиолетово-бурых оттенков, то продолжают инкубацию проб ещё 3 минуты в тех же условиях. Затем в каждую пробирку добавляют по 2 капли реактива Люголя и наблюдают за развитием окраски.

Оформление работы

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

№ проб	Температура инкубации	Окраска с йодом	Скорость реакции
1 + 5	0°C		
2 + 6	20°C		
3 + 7	38-40°C		
4 + 8	100°C		

Лабораторная работа 2

Влияние активаторов и ингибиторов на активность амилазы

Принцип

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

Реактивы:

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

Материал для исследования

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

Проведение реакции

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

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

Оформление работы

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

Лабораторная работа 3

Оценка специфичности действия уреазы

Реактивы

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

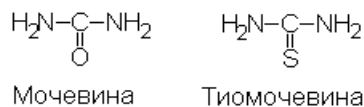
Материал для исследования

Препарат уреазы (препарат готовит дежурный для всей группы: очищает 3-4 семечка арбуза, зёрна тщательно растирает в ступке с 1 мл дистиллированной воды, доводит объём до 10 мл

и фильтрует полученную эмульсию через воронку с двойным слоем марли; профильтрованную эмульсию используют как препарат уреазы).

Принцип

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



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



Проведение реакции

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

Оформление работы

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

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

Лабораторная работа 4 **Обнаружение ферментов разных классов**

Реактивы

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

АНАЛИЗ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ КЛАССА ГИДРОЛАЗ

подкласс – гликозидазы

Материал для исследования

Слюна (разведение 1:10).

Принцип

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

Проведение анализа

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

Практическое значение

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

АНАЛИЗ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ КЛАССА ОКСИДОРЕДУКТАЗ

1) подкласс – каталазы

Материал для исследования

Свежая кровь.

Принцип:

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

Ход работы:

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

2) подкласс – анаэробные дегидрогеназы

Материал для исследования

1) Кипяченые дрожжи, 2) некипяченые дрожжи.

Принцип:

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

Ход работы:

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

Оформление работы

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

Вопросы для самоконтроля

1. Природа, структурно-функциональная организация и роль простых и сложных ферментов. Классификация и роль кофакторов (коферментов и др.)
2. Механизм действия и свойства ферментов. Регуляция действия ферментов.
3. Современная номенклатура и классификация ферментов.
4. Принципы количественного определения активности ферментов. Единицы измерения активности ферментов.
5. Практическое использование ферментов и их ингибиторов в медицине.

ТЕМА 2.2

СТРОЕНИЕ, КЛАССИФИКАЦИЯ И РОЛЬ ВИТАМИНОВ

Актуальность

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

Цель

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

Вопросы для самоподготовки

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

Самостоятельная работа

Заполнить графы 1-8 в Приложении 2 (таблица витаминов и витаминоподобных веществ, в которой графа 9 заполняется по мере изучения разделов предмета биологической химии в течение года).

Лабораторная работа 1

Реакции на жирорастворимые витамины

Реактивы

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

РЕАКЦИЯ НА РЕТИНОЛ (ВИТАМИН А)

Принцип

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

Материал для исследования

Витамин А (0,05 % масляной раствор).

Проведение анализа

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

РЕАКЦИЯ НА КАЛЬЦИФЕРОЛ (ВИТАМИН D)

Принцип

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

Материал для исследования

Витамин D (масляной раствор).

Проведение анализа

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

РЕАКЦИЯ НА ТОКОФЕРОЛ (ВИТАМИН E)

Принцип

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

Материал для исследования

Витамин E (0,1 % спиртовой раствор).

Проведение анализа

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

РЕАКЦИЯ НА ВИКАСОЛ (СИНТЕТИЧЕСКИЙ АНАЛОГ ВИТАМИНА K₁)

Принцип

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

Материал для исследования

Викасол (0,05 % раствор).

Проведение анализа

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

Оформление работы

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

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

Лабораторная работа 2

Реакции на водорастворимые витамины

Реактивы:

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

Оборудование

Электроплитка, беззольные фильтры, ртутно-кварцевая лампа.

Материал для исследования

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

РЕАКЦИЯ НА ТИАМИН (ВИТАМИН B₁)

Принцип

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

Проведение анализа

К 1-2 каплям раствора или 1-2 мг порошка тиамин прибавляют 5-10 капель раствора NaOH и 2 капли раствора K₃[Fe(CN)₆], перемешивают, нагревают на спиртовке, наблюдают флуоресценцию в лучах ртутно-кварцевой лампы.

РЕАКЦИИ НА РИБОФЛАВИН (ВИТАМИН B₂)

Реакция восстановления

Принцип

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

Проведение анализа

0,025 % раствор рибофлавина. К 10 каплям раствора витамина B₂ добавляют 5 капель концентрированной HCl и гранулу металлического цинка. Жидкость окрашивается в розовый цвет, затем обесцвечивается. Сравнить обе получаемых формы витамина B₂ (родофлавин и лейкоформу) по степени флуоресценции.

Реакция флуоресценции

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

Принцип

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

Проведение анализа

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

РЕАКЦИЯ НА НИКОТИНОВУЮ КИСЛОТУ (ВИТАМИН В₅)

Принцип

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

Проведение анализа

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

РЕАКЦИЯ НА ПИРИДОКСИН (ВИТАМИН В₆)

Принцип

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

Проведение анализа

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

РЕАКЦИЯ НА КОБАЛАМИН (ВИТАМИН В₁₂)

Принцип

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

Проведение анализа

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

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

РЕАКЦИИ НА АСКОРБИНОВУЮ КИСЛОТУ (ВИТАМИН С)

Принцип

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

Проведение анализа

1 реакция

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

2 реакция

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

3 реакция

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

Практическое значение

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

Оформление работы

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

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

Вопросы для самоконтроля

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

Тестовые задания

Выбрать один правильный ответ.

1. ОСНОВНАЯ ФУНКЦИЯ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ – ЭТО

- 1) защита транспорта субстратов в клетки
- 2) защита биологических мембран
- 3) предшественники коферментов
- 4) предшественники углеводов
- 5) предшественники гормонов

2. ПАНТОТЕНОВАЯ КИСЛОТА ЯВЛЯЕТСЯ СОСТАВНОЙ ЧАСТЬЮ КОФЕРМЕНТА

- 1) коэнзим А
- 2) тетрагидрофолиевая кислота
- 3) тиаминпирофосфат
- 4) флавинмонопнуклеотид
- 5) коэнзим Q

3. ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ПРИЕМЕ АНТИБИОТИКОВ И СУЛЬФАНИЛАМИДОВ РАЗВИВАЕТСЯ ГИПОВИТАМИНОЗ ПО ВИТАМИНУ В₆, ОБУСЛОВЛЕННЫЙ

- 1) подавлением микрофлоры кишечника
- 2) связыванием лекарства с витамином
- 3) действием лекарства на синтез коферментной формы
- 4) ингибированием пиридоксин-зависимых ферментов
- 5) блокированием трансмембранного переноса витамина

4. ПРИ ДЕФИЦИТЕ ВИТАМИНА С РАЗВИВАЕТСЯ ЦИНГА ВСЛЕДСТВИЕ

- 1) окисления сульфгидрильных групп ферментов
- 2) нарушения синтеза коллагена
- 3) нарушения синтеза альбумина
- 4) окисления липидных мембран клеток соединительной ткани
- 5) нарушения транспорта кальция

5. В СОСТАВ ВИТАМИНА F ВХОДЯТ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ

- 1) олеиновая, линолевая и линоленовая
- 2) олеиновая, линолевая и стеариновая
- 3) арахидоновая, линолевая и линоленовая
- 4) олеиновая, линолевая и арахидоновая
- 5) олеиновая, линоленовая и арахидоновая

6. ОСНОВНАЯ РОЛЬ ВИТАМИНА К СОСТОИТ В ТОМ, ЧТО ОН

- 1) является антиоксидантом
- 2) увеличивает образование тромбоцитов
- 3) участвует в синтезе факторов свертывания крови
- 4) участвует в реакциях протеолиза
- 5) участвует в реакциях минерализации

7. ФЕРМЕНТ В ОТЛИЧИЕ ОТ НЕБЕЛКОВОГО КАТАЛИЗАТОРА

- 1) снижает энергию активации
- 2) не расходуется в результате реакции
- 3) не претерпевает необратимых изменений
- 4) обладает специфичностью
- 5) требуется в малом количестве

8. ПЕРЕНОС ГРУПП ВНУТРИ МОЛЕКУЛЫ КАТАЛИЗИРУЮТ ФЕРМЕНТЫ

- 1) изомеразы
- 2) трансферазы
- 3) лиазы
- 4) гидролазы
- 5) лигазы

9. СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ОБУСЛОВЛЕНА

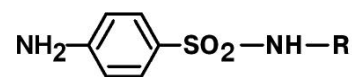
- 1) набором определенных функциональных групп в активном центре
- 2) химическим соответствием активного центра субстрата
- 3) наличием кофермента
- 4) пространственным соответствием активного центра субстрата
- 5) комплементарностью активного центра субстрату

10. ДЕЙСТВИЕ КОНКУРЕНТНОГО ИНГИБИТОРА МОЖНО СНЯТЬ, ЕСЛИ

- 1) увеличить концентрацию ингибитора
- 2) увеличить концентрацию субстрата
- 3) снизить концентрацию фермента
- 4) изменить условия реакции – pH и температуру
- 5) снизить коллоидоустойчивость фермента

Ситуационные задачи

1. Обнаружено, что если аллостерический фермент аспартат:карбамоил-трансфераза (молекула которого состоит из 12 протомеров) выдержать в течение 4 минут при 60°C, то он теряет чувствительность к действию аллостерического ингибитора (ЦТФ). При этом ферментативная каталитическая активность у него сохраняется. Схожие свойства проявляют и другие аллостерические ферменты. *Предложить возможные механизмы появления подобного нарушения.*
2. Липаза – фермент жировой ткани, обеспечивающий расщепление депонированных нейтральных жиров, может находиться в двух формах с различной активностью: в виде простого белка и в виде фосфопротеина. *Объяснить, почему переход одной формы в другую сопровождается изменением активности. Предположить, в каком состоянии липаза является активной, если известно, что выделяющийся при физической нагрузке гормон адреналин запускает каскад реакций, ведущих к фосфорилированию внутриклеточных белков.*
3. В качестве антибактериальных средств широкого спектра действия первыми стали использовать сульфаниламиды, содержащие структуру, схожую с парааминобензойной кислотой. *Указать, на чем основано использование сульфаниламидов и что ещё обычно рекомендуют принимать в случае применения сульфаниламидов для лечения заболеваний в клинике.*
4. Бактерии *Lactobacillus casei* растут на простой культуральной среде, содержащей два витамина рибофлавин и пиридоксин и всего четыре протеиногенных аминокислоты. Если в культуральную среду добавить полный набор из 20 протеиногенных аминокислот и рибофлавин, то количество пиридоксина, необходимого для оптимального роста бактерий, сократится на 90 %. *Пояснить, почему происходит этот феномен.*



Строение сульфаниламидов

ТЕМА

"БЕЛКИ. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ. ФЕРМЕНТЫ. ВИТАМИНЫ" (КОНТРОЛЬНОЕ ЗАНЯТИЕ ПО РАЗДЕЛАМ 1 И 2)

Вопросы для самоподготовки

Белки. Нуклеиновые кислоты

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

Ферменты. Витамины

1. Понятие о ферментах. История изучения энзимологии.
2. Химическая природа ферментов. Сходство и различия между ферментами и неферментными катализаторами.
3. Проферменты, изоферменты, множественные формы фермента.
4. Структурно-функциональная организация ферментов: уровень структуры, простые и сложные ферменты, холофермент, роль апофермента и кофактора (кофермента, простетической группы) в катализе, активный и аллостерический центры.
5. Кинетика ферментативных процессов. Механизмы катализа: ковалентный, кислотно-основной и др.

6. Свойства ферментов: специфичность, влияние температуры, рН среды, количества субстрата; активация и ингибирование, типы и обратимость ингибирования.
7. Регуляция активности ферментов: аллостерические механизмы, фосфорилирование и дефосфорилирование, частичный протеолиз, белок-белковые взаимодействия, компартиментализация и др.
8. Принципы современной номенклатуры и классификации ферментов. Характеристика ферментов по схеме: класс, основные подклассы, строение, коферменты, катализируемая реакция, биологическая роль.
9. Принципы количественного определения активности ферментов. Единицы активности ферментов.
10. Использование ферментов в медицине: энзимодиагностика, энзимопатология, энзимотерапия (ферменты и ингибиторы ферментов). Значение определения изоферментов в клинической практике.
11. Признаки витаминов и витаминоподобных веществ. Ученые - основоположники витаминологии. Классификация и номенклатура витаминов.
12. Гипо- и авитаминоз экзо- и эндогенный. Гипервитаминоз.
13. Провитамины и авитамины (примеры).
14. Строение витаминов А, D₃, Е, С, Н, В₁, В₂, В₆, РР, активные центры, коферментная роль биологически активных форм (ФМН/ФАД, НАД⁺/НАДФ⁺, ТДФ, ПФ и др.). Представления о строении, роли витаминов К, F, В₃, В₁₂, В_С.
15. Характеристика витаминов по плану: 1) химическая структура, активная форма; 2) источники, образование из провитамина; 3) суточная потребность; 4) биологическая роль; 5) недостаточность, гипервитаминоз (если есть).
16. Витамины - лекарственные препараты.

Практическая часть

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

РАЗДЕЛ 3

ВВЕДЕНИЕ В ОБМЕН ВЕЩЕСТВ И ЭНЕРГИИ. БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ

ТЕМА 3.1

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

Актуальность

Биологическое окисление протекает во всех живых клетках организма в виде совокупных окислительных реакций. Основной функцией этого процесса является обеспечение организма энергией для процессов жизнедеятельности. Основной формой 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. В организме существуют альтернативные биологическому окислению пути использования кислорода.

Цель

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

Вопросы для самоподготовки

1. Понятие об обмене веществ. Пластическая и энергетическая роль метаболизма.
2. Взаимосвязь катаболизма и анаболизма, энергетика и субстраты процессов.
3. Этапы катаболизма. Стадии катаболических превращений питательных веществ в организме, связанные с высвобождением свободной энергии.
4. Формы трансформации свободной энергии – образование восстановленных эквивалентов (НАДФН·Н) и синтез "макроэргических" соединений (АТФ, 1,3-дифосфоглицерат, креатинфосфат, ацетил~SКоА и др.).
5. Строение мультиферментного пируватдегидрогеназного комплекса, ферменты, роль коферментов и работа их активных центров. Механизм окислительного декарбоксилирования пирувата.
6. Ацетил~КоА – ключевая фигура метаболизма.
7. Цикл трикарбоновых кислот (ЦТК, цикл Кребса) – универсальный механизм окисления. Схема взаимосвязей ЦТК с распадом углеводов, липидов, белков.
8. Химические реакции цикла Кребса. Дегидрогеназы ЦТК и их коферменты. Механизм субстратного фосфорилирования в ЦТК. Биологическая роль цикла Кребса.

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

Самостоятельная работа

Составить схему общих путей энергетического обмена в ходе изучения раздела 3. На схеме представить химизм и взаимосвязи пируватдегидрогеназного комплекса и цикла трикарбоновых кислот с энергетической цепью внутренней мембраны митохондрий. Приложить к схеме суммарные реакции показанных путей обмена, энергетическую лестницу, указать значение митохондриального потенциала.

Тестовые задания

Выбрать один правильный ответ.

1. СКОРОСТЬ ПИРУВАТДЕГИДРОГЕНАЗНОЙ РЕАКЦИИ ИНГИБИРУЮТ
 - 1) АТФ, кальций, НАД⁺
 - 2) кальций, ацетил-КоА, НАД⁺
 - 3) АДФ, ФАДН₂, НАДН
 - 4) ацетил-КоА, НАДН, АТФ

2. В ЦИКЛЕ ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ МОЛЕКУЛА ФАДН₂ ОБРАЗУЕТСЯ ПРИ РАБОТЕ ФЕРМЕНТА
 - 1) малатдегидрогеназы
 - 2) изоцитратдегидрогеназы
 - 3) сукцинатдегидрогеназы
 - 4) α-кетоглутаратдегидрогеназы

3. СКОРОСТЬ ЦИКЛА ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ ОПРЕДЕЛЯЕТСЯ
КОНЦЕНТРАЦИЕЙ

- 1) α -кетоглутарата
- 2) оксалоацетата
- 3) янтарной кислоты
- 4) цитрата
- 5) яблочной кислоты

4. ДВИЖУЩЕЙ СИЛОЙ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ ПО ЦЕПИ ДЫХАТЕЛЬНЫХ
ФЕРМЕНТОВ ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) энергия распада АТФ
- 2) перекачивание протонов водорода через мембрану
- 3) работа железосерных центров
- 4) различная электроотрицательность переносчиков
- 5) строение цитохромов

5. В ДЫХАТЕЛЬНОМ КОНТРОЛЕ ПРОЯВЛЯЕТСЯ ЗАВИСИМОСТЬ СКОРОСТИ
ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ ПО ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ ОТ

- 1) соотношения концентрации АДФ и АТФ
- 2) концентрации НАДН
- 3) количества потребляемого кислорода
- 4) активности АТФ-синтетазы
- 5) работы транслоказ по переносу АТФ и АДФ

6. УВЕЛИЧЕНИЕ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО ГРАДИЕНТА ПРИВЕДЕТ

- 1) к увеличению скорости перекачивания протонов
- 2) к ускорению синтеза АТФ
- 3) к повышению скорости переноса электронов
- 4) к повышенному выделению CO_2
- 5) к повышенному выделению H_2O

7. ЭНЕРГИЯ, ВЫСВОБОЖДАЕМАЯ ПРИ ПЕРЕНОСЕ ЭЛЕКТРОНОВ ПО ЦЕПИ
ДЫХАТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ, ИСПОЛЬЗУЕТСЯ НА

- 1) перекачивание ионов H^+ через мембрану
- 2) окисление железосерных центров
- 3) образование молекул воды
- 4) синтез АТФ
- 5) доставку АТФ в цитоплазму

8. ПРОТОННЫЙ ГРАДИЕНТ НА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ МЕМБРАНЕ ОБУСЛОВЛЕН

- 1) распадом АТФ
- 2) окислением НАДН
- 3) движением электронов
- 4) выкачиванием ионов H^+ в обмен на Na^+
- 5) изменением редокс-состояния фосфолипидов

9. ВНЕДРЕНИЕ РАЗОБЩИТЕЛЯ В МИТОХОНДРИАЛЬНУЮ МЕМБРАНУ ПРИВЕДЕТ

- 1) к снижению окисления НАДН
- 2) к активации синтеза АТФ
- 3) к снижению переноса электронов по дыхательной цепи
- 4) к увеличению протонного градиента

10. ОБРАЗУЮЩИЕСЯ В ЦИКЛЕ ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ ВОССТАНОВЛЕННЫЕ ЭКВИВАЛЕНТЫ ИСПОЛЬЗУЮТСЯ

- 1) в цепи дыхательных ферментов
- 2) в реакциях синтеза глюкозы, жирных кислот
- 3) для работы АТФ-синтетазы
- 4) для синтеза ацетил-КоА

Ситуационные задачи

Ответы подробно и мотивированно объяснить.

1. Прием внутрь разобщающих агентов вызывает обильное потоотделение и повышение температуры тела. Дайте этому объяснение на молекулярном уровне. *Как изменяется соотношение P/O в присутствии разобщающих агентов? Можно ли использовать разобщители для борьбы с ожирением?*
2. Особая жировая ткань – бурый жир – имеется у новорожденных, а также у некоторых животных, впадающих в зимнюю спячку или приспособленных к обитанию в холодных регионах планеты. В митохондриях бурого жира выход АТФ на 1 атом поглощенного кислорода составляет менее 1 молекулы, в то время как в других тканях 2-3 молекулы. *Какая физиологическая функция может определяться таким низким отношением P/O в буром жире новорожденных? Каковы возможные механизмы, способные пределять столь низкое отношение P/O, которое характерно для митохондрий бурого жира?*

РАЗДЕЛ 4

СТРОЕНИЕ, ФУНКЦИИ, ОБМЕН УГЛЕВОДОВ

ТЕМА 4.1

СТРОЕНИЕ, ВНЕШНИЙ ОБМЕН, ДЕПОНИРОВАНИЕ УГЛЕВОДОВ

Актуальность

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

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

Цель

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

Вопросы для самоподготовки

1. Структура основных представителей моно-, ди-, полисахаридов (рибоза, глюкоза, фруктоза, галактоза, мальтоза, лактоза, сахароза, крахмал, гликоген, целлюлоза, декстрины, леваны). Их происхождение, биологическая роль. Сходство и отличие структур крахмала, гликогена, целлюлозы.
2. Углеводы, поступающие в организм с пищей. Суточная потребность в углеводах.
3. Ферменты пищеварительных соков, участвующие в переваривании углеводов: класс, подкласс, локализация синтеза. Комплексы пристеночного пищеварения.
4. Реакции, катализируемые α -амилазой, конечной декстриназой, мальтазой, лактазой, сахаразой. Конечные продукты реакций.
5. Причины неперевариваемости целлюлозы в желудочно-кишечном тракте человека. Роль целлюлозы в рационе питания.
6. Реакции синтеза и распада гликогена. Физиологическое значение и соотношение процессов в зависимости от ритма питания и режима работы мышц. Особенности обмена гликогена в печени и мышцах.
7. Аденилатциклазный механизм регуляции активности ферментов обмена гликогена. Влияние адреналина, глюкагона и инсулина на концентрацию цАМФ в клетке.
8. Участие ионов Ca^{2+} в регуляции активности ферментов обмена гликогена.
9. Биохимические основы наследственных нарушений переваривания углеводов и обмена гликогена (лактозная интолерантность, непереносимость сахарозы, гликогенозы и агликогенозы).
10. Особенности утилизации простых сахаров микрофлорой полости рта. Понятие «метаболический взрыв», направления синтеза полимерных углеводов.

Самостоятельная работа

В ходе изучения раздела 4 дополнить схему энергетического обмена (см. раздел 3) до общей схемы углеводно-энергетического обмена. По теме 4.1 на схеме представить химизм и взаимосвязи гликогеногенеза и гликогенолиза, их выход на общие пути катаболизма (пируватдегидрогеназный комплекс и цикл трикарбоновых кислот с энергетической цепью внутренней мембраны митохондрий). Приложить к схеме суммарные реакции показанных путей обмена.

Лабораторная работа 1

Исследование влияния амилазы на крахмал и целлюлозу

Крахмал является гомополисахаридом, состоящим из α -амилозы и амилопектина.

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

Принцип

Ферменты, содержащиеся в биологических жидкостях, расщепляют полисахариды. Продукты переваривания полисахаридов определяют с помощью реакции Троммера, выявляющей у высвобождаемых при гидролизе сахаров (глюкозы и мальтозы) способность к восстановлению $\text{Cu}(\text{OH})_2$ голубого цвета в CuOH желтого цвета и CuO красного цвета при нагревании в щелочной среде.

Материал для исследования

Слюна (разведение 1:5).

Реактивы

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

Проведение анализа

Готовят пробы соответственно таблице.

N пробы	Крахмал, мл	Суспензия целлюлозы, мл	Слюна, мл	Желудочный сок, мл	Панкреатин, мл
1	1,0	-	1,0	-	-
2	1,0	-	-	1,0	-
3	1,0	-	1,0	1,0	-
4	1,0	-	-	-	2,0
5	-	1,0	1,0	-	-
6	-	1,0	-	1,0	-
7	-	1,0	1,0	1,0	-
8	-	1,0	-	-	2,0

Пробирки инкубируют 30 мин при 37°C в термостате или водяной бане. После инкубации проводят анализ на присутствие продуктов расщепления полисахарида с помощью реакции Троммера. В каждую из 8 пробирок добавляют по 1 мл раствора NaOH и по 5 капель раствора CuSO_4 . Все пробирки ставят в кипящую водяную баню, кипятят 1 мин. Появление красного осадка оксида меди (I) указывает на положительную реакцию Троммера в присутствии глюкозы, мальтозы.

Оформление работы

Указывают принцип метода, итоги работы оформляют в виде таблицы:

№ проб	Субстрат	Источник фермента	Фермент	Результат

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

Лабораторная работа 2

Исследование влияния амилазы на крахмал и сахарозу

Реактивы

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

Материал для исследования

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

Принцип

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

Проведение реакции

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

Оформление работы

Указывают принцип метода, регистрируют результаты в таблице:

№ проб	Субстрат	Источник фермента	Фермент	Результат
1				
2				

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

Вопросы для самоконтроля

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

ТЕМА 4.2

АНАЭРОБНЫЙ И АЭРОБНЫЙ ОБМЕН УГЛЕВОДОВ

Актуальность:

Гликолиз - центральный путь катаболизма глюкозы, может поставлять углеродный скелет для процессов биосинтеза. В анаэробных условиях гликолиз - единственный процесс в организме, поставляющий энергию. Именно благодаря гликолизу организм может осуществлять ряд физиологических функций в условиях гипоксии, платой за это становится накопление лактата. У некоторых анаэробных организмов, таких как дрожжи, а также в некоторых клетках высших организмов (например, эритроцит) анаэробное превращение углеводов является единственным источником АТФ. В аэробных условиях при отсутствии НАДН гликолиз не может быть завершён и становится начальной стадией расщепления энергетических субстратов (до промежуточного продукта – пирувата), которую продолжают реакции аэробного окисления до CO_2 , H_2O , сопряженные с образованием АТФ.

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

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

Цель

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

Вопросы для самоподготовки

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

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

Самостоятельная работа

Дополнить схему углеводно-энергетического обмена (темы 3.1 и 4.1). По теме 4.2 на схеме представить химизм и взаимосвязи основных метаболических путей обмена глюкозы – гликолиз и глюконеогенез, пентозофосфатный цикл, их выход на общие пути катаболизма (ПДГ-комплекс и ЦТК с энергетической цепью митохондрий) для создания целостного представления об углеводно-энергетических потоках в организме. Приложить суммарные реакции показанных путей обмена.

Лабораторная работа 1

Обнаружение молочной кислоты в биологических пробах

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

Принцип

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

Реактивы

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

ОБНАРУЖЕНИЕ ЛАКТАТА В МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

Материал для исследования

Мышечная каша.

Проведение анализа

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

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

ОБНАРУЖЕНИЕ ЛАКТАТА В ЖЕЛУДОЧНОМ СОКЕ

Материал для исследования

Патологический желудочный сок.

Проведение анализа

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

Оформление работы

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

Исследуемая проба	Результат
Экстракт мышечной ткани	
Патологический желудочный сок	

Практическое значение

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

Лабораторная работа 2 **Определение содержания глюкозы в сыворотке крови**

Благодаря наличию сложных механизмов регуляции, включающих центральную нервную, эндокринную системы и деятельность печени, содержание глюкозы в крови здорового человека довольно постоянно и колеблется от 3,3 до 5,8 ммоль/л. Значительные отклонения в сторону увеличения содержания глюкозы называют гипергликемией (гиперглюкоземией), в сторону уменьшения - гипогликемией (гипоглюкоземией). Для оценки содержания глюкозы в крови используют различные методы (редуктометрические, колориметрические, электрохимические, ферментативные), среди которых унифицированным является глюкозооксидазный. Метод специфичен, его можно использовать не только для оценки содержания глюкозы в плазме, сыворотке и цельной крови, но и в спинномозговой жидкости, трансудатах, экссудатах.

Принцип

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

Материал для исследования

Сыворотка крови.

Реактивы

1) Рабочий реагент (содержит фенол, 4-амино-антипирин, глюкозооксидазу, пероксидазу, в калиево-фосфатном буфере), 2) 5,55 ммоль/л стандартный раствор глюкозы.

Проведение анализа

Готовят опытную и стандартную пробы согласно таблице.

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

Расчет

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

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

Нормальные величины

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

Оформление работы

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

Практическое значение

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

К *физиологической гипергликемии* относят алиментарную (одномоментный прием больших количеств легкоусвояемых углеводов) и нейрогенную (выброс в кровь больших количеств катехоламинов при стрессе). Физиологические гипергликемии носят транзиторный характер и достаточно быстро проходят.

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

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

Патологическая гипогликемия наблюдается при заболеваниях поджелудочной железы с гиперплазией β -клеток островков Лангерганса – гиперинсулинизм (инсулома, аденома, рак поджелудочной железы). Самая частая причина гипогликемий – передозировка инсулина. Причиной гипогликемии может стать снижение продукции гормонов-антагонистов инсулина при гипофункции коры надпочечников (Аддисонова болезнь, опухоли надпочечников), ги-

пофункции и атрофии передней доли гипофиза (болезнь Симмондса), гипофункции щитовидной железы. Нейрогенная гипогликемия наблюдается при заболеваниях нервной системы (энцефалит, прогрессивный паралич и др.), психических заболеваниях (хронический алкоголизм, циклотемия и др.), травмах головного мозга. Гипогликемия может возникать при тяжелых поражениях печени (отравления фосфором, хлороформом, острая желтая дистрофия печени, цирроз и др.), гликогенозах (болезнь Гирке) вследствие невозможности превращения гликогена в глюкозу. Гипогликемия при заболеваниях почек обусловлена потерей значительного количества глюкозы с мочой вследствие снижения почечного порога для глюкозы. Гипогликемия наблюдается при врожденных дефектах жирового и углеводного обмена в связи с неспособностью организма эффективно мобилизовать свои энергетические ресурсы.

Лабораторная работа 3

Влияние сахарной нагрузки на содержание глюкозы в крови

(глюкозотолерантный тест)

Метод сахарной нагрузки (глюкозотолерантный тест (ГТТ) или тест на толерантность к глюкозе (ТТГ)) информативен для выявления скрытой формы сахарного диабета и нарушения гликогенообразовательной функции печени.

Принцип

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

Материал для исследования

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

Проведение анализа

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

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

Готовят опытные и стандартную пробы согласно таблице

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

Расчет

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

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

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

Нормальные величины

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

Практическое значение

Уровень глюкозы в крови у здоровых лиц после нагрузки глюкозой:

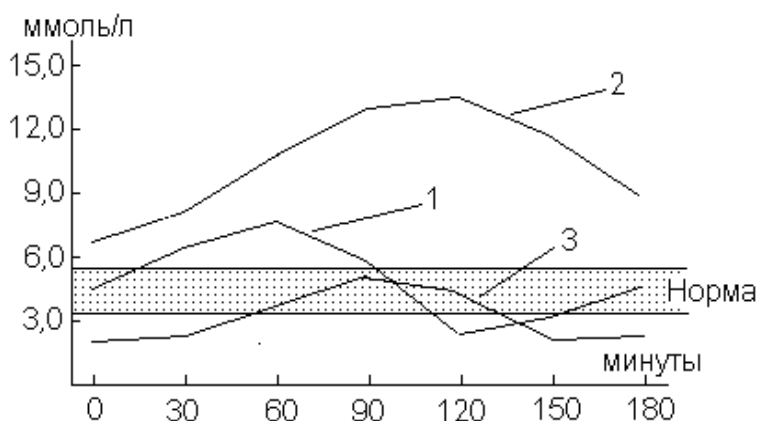
1. Через 30-60 мин после приема глюкозы наблюдается максимальное увеличение содержания глюкозы в крови: на 35-80% выше исходного. Повышение содержания глюкозы в течение 1-го часа после ее приема объясняется переходом ее в кровь и в значительной мере определяется быстротой всасывания, гликогенсинтезирующей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

2. Через 90-120 мин содержание глюкозы в крови возвращается к норме и иногда может быть даже ниже исходной величины. Уровень глюкозы в крови в этот период падает из-за усиленного выделения инсулина поджелудочной железой в ответ на развивающуюся гипергликемию, а глюкоза переходит в ткани. Инсулина выделяется больше, чем требуется для восстановления нормального уровня глюкозы в крови, что приводит к небольшой гипогликемии.

3. К 150-180 мин содержание глюкозы в крови возвращается к исходному за счёт того, что достигается равновесие всех систем регуляции уровня глюкозы в крови.

В клинической практике выделяют несколько видов гликемических кривых – нормальная, гипергликемическая и гипогликемическая:

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



Типы гликемических кривых:

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

Гипергликемические кривые наблюдают при явных и скрытых формах сахарного диабета, повреждении паренхимы печени, гиперфункции щитовидной железы и коры надпочечников, тяжелых формах анемии, токсикозах, болезнях центральной нервной системы, инфекцион-

ных болезнях (ревматизм, сепсис, тиф, дизентерия, дифтерия, бронхопневмония), панкреатите, гликогеновой болезни.

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

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

У здорового человека нагрузка глюкозой не вызывает глюкозурию.

Оформление работы

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

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

Лабораторная работа 4

Экспресс-метод оценки содержания глюкозы в моче

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

Материал для исследования

Моча нормальная и патологическая (содержит глюкозу).

Реактивы

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

Принцип

На конце полоски «Глюкотест» имеется полоса светло-желтого цвета, пропитанная растворами ферментов - глюкозооксидазы, пероксидазы и красителем. Глюкоза с помощью глюкозооксидазы окисляется кислородом воздуха до глюконовой кислоты с образованием пероксида водорода, который в присутствии пероксидазы окисляет краситель, превращая его в окрашенное соединение. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию глюкозы и сравнивается с цветной шкалой из набора.

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

Проведение анализа

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

Практическое значение

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

Нормальные величины

Моча 0,06-0,83 ммоль/л

Оформление работы

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

Исследуемый материал	Результат
нормальная моча	
патологическая моча	

Вопросы для самоконтроля

1. Пути использования углеводов в организме.
2. Реакции гликолиза, гликогенолиза и гликогеногенеза. Локализация и значение процессов. Спиртовое брожение.
3. Включение фруктозы и галактозы в процесс гликолиза.
4. Глюконеогенез, его субстраты, энергообеспечение, значение.
5. Этапы аэробного распада глюкозы: окисление до пирувата, окислительное декарбоксилирование пирувата, цикл Кребса и его сопряжение с дыхательной цепью митохондрий. Эффект Пастера.
6. Пентозофосфатный путь окисления углеводов, связь с гликолизом, энергетика и значение.
7. Регуляция и нарушения углеводного обмена. Сахарный диабет, гипоксия.

Тестовые задания

Выбрать один правильный ответ.

1. МАЛЬТАЗА СИНТЕЗИРУЕТСЯ КЛЕТКАМИ

- 1) поджелудочной железы
- 2) слизистой желудка
- 3) слизистой тонкого кишечника
- 4) слизистой толстого кишечника
- 5) гепатоцитами

2. УГЛЕВОД, В КОТОРОМ ГЛЮКОЗА И ФРУКТОЗА СОЕДИНЕННЫ α -1,2-ГЛИКОЗИДНОЙ СВЯЗЬЮ, НАЗЫВАЕТСЯ

- 1) лактоза
- 2) мальтоза

- 3) сахароза
- 4) мальтодекстрин
- 5) целлобиоза

3. ПРИ ПИЩЕВАРЕНИИ ПРОИСХОДИТ

- 1) распад дисахаридов до CO_2 и воды
- 2) расщепление полисахаридов до олиго- и моносахаридов
- 3) гидролиз целлюлозы
- 4) распад глюкозы с образованием лактата

4. КЛЮЧЕВОЙ ФЕРМЕНТ МОБИЛИЗАЦИИ ГЛИКОГЕНА НАЗЫВАЕТСЯ

- 1) гликогенсинтаза
- 2) амилаза
- 3) гексокиназа
- 4) гликогенфосфорилаза
- 5) глюкокиназа

5. АНАЭРОБНОЕ ПРЕВРАЩЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ В ЛАКТАТ АКТИВНО ПРОТЕКАЕТ В

- 1) клетках нервной ткани
- 2) клетках коркового слоя почек
- 3) эритроцитах
- 4) миокардиоцитах

6. КОНЕЧНЫЙ ПРОДУКТ ГЛИКОЛИЗА ЛАКТАТ МОЖЕТ БЫТЬ РЕСИНТЕЗИРОВАН В ГЛЮКОЗУ В КЛЕТКАХ

- 1) скелетных мышц
- 2) нервной ткани
- 3) печени
- 4) ткани почки
- 5) кардиомиоцитах

7. ПРИ КРАТКОМ ГОЛОДАНИИ АКТИВИРУЕТСЯ

- 1) гликолиз в мышцах
- 2) гликогенолиз в сердечной ткани
- 3) гликогенолиз в печени
- 4) синтез гликогена в печени
- 5) синтез гликогена в мышцах

8. ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ (БОЛЕЕ СУТОК) ГОЛОДАНИИ АКТИВИРУЕТСЯ

- 1) гликолиз в мышцах
- 2) гликогенолиз в печени
- 3) глюконеогенез
- 4) синтез гликогена в печени
- 5) синтез гликогена в мышцах

9. СКОРОСТЬ ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗА УВЕЛИЧИВАЕТСЯ

- 1) кортизолом
- 2) повышенной концентрацией АДФ и АМФ
- 3) инсулином
- 4) высокой концентрацией НАД^+ и ФАД
- 5) высокой концентрацией ФМН и коQ

10. РОЛЬ ПЕНТОЗОФОСФАТНОГО ПУТИ ЗАКЛЮЧАЕТСЯ В

- 1) образовании глюкозы
- 2) генерации НАДФН
- 3) снабжении тканей АТФ
- 4) образовании лактата
- 5) образовании глицерола

Ситуационные задачи

Ответы подробно объяснить.

1. Ребенку 7 лет необходимо определить сахар в крови для выявления сахарного диабета. Перед проведением пробы в лаборатории он очень волновался, плакал. В ходе анализа установлено, что у ребенка уровень сахара в крови выше нормы. *Пояснить, можно ли утверждать после такого исследования, что у ребенка сахарный диабет.*

2. Один спортсмен пробежал на соревнованиях дистанцию 100 м, другой – 5000 метров. *Пояснить, у какого из них выше содержание молочной кислоты в крови и почему.*

3. В костном мозге у больного, перенесшего кровотечение, меняется соотношение между пентозофосфатным и гликолитическим путями обмена углеводов. *Пояснить, как изменится соотношение и почему возникает такой сдвиг. Указать ферменты, активность которых целесообразно исследовать для проверки предположения.*

РАЗДЕЛ 5

СТРОЕНИЕ, ФУНКЦИИ, ОБМЕН ЛИПИДОВ

ТЕМА 5.1

СТРОЕНИЕ, ФУНКЦИИ, ВНЕШНИЙ ОБМЕН, ДЕПОНИРОВАНИЕ ЛИПИДОВ

Актуальность

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

Цель

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

Вопросы для самоподготовки

1. Понятие “липиды”. Классификация, краткая характеристика основных групп: структура, свойства, биологическая роль.
2. Жирные кислоты. Строение, классификации, физико-химические свойства, источники в организме, биологическая роль, транспорт и использование.
3. Строение полиненасыщенных ω -3– и ω -6-жирных кислот (линолевая, α - и γ -линоленовая, арахидоновая), биологическая роль. Синтез эйкозаноидов на основе арахидоновой кислоты с участием циклооксигеназы (простагландины, простациклины, тромбоксаны) и липоксигеназы (лейкотриены). Биологическая роль отдельных типов эйкозаноидов.
4. Триацилглицеролы (ТАГ) как нейтральные жиры: жирнокислотный состав, свойства, источники в организме, биологическая роль.
5. Холестерол: строение, функции, пути использования, главные производные.
6. Сложные липиды: глицеро- и сфингофосфолипиды, гликолипиды (цереброзиды, ганглиозиды, сульфолипиды), строение и биологическая роль.
7. Внешний обмен липидов. Разнообразие пищевых жиров, суточная потребность, переваривание. Состав и роль желчи, значение парных желчных кислот (синтез и формулы таурохолевой и гликохолевой кислот). Эмульгирование пищевых жиров, схема эмульгированной капли.
8. Ферменты переваривания нейтральных и сложных жиров, место синтеза, активация. Построение мицелл из продуктов переваривания, всасывание.
9. Нарушения внешнего обмена липидов (переваривания и всасывания), причины и последствия (гиповитаминозы, стеаторея).
10. Пути ресинтеза липидов в клетках кишечника (ТАГ, фосфолипиды, эфиры холестерола). Реакции и значение процесса.
11. Хиломикроны: состав, построение, функция, значение апобелков. Транспорт нейтрального жира к местам депонирования и утилизация хиломикронов в тканях. Роль и регуляция липопротеинлипазы.

12. Липопротеины очень низкой плотности: образование, функции, строение, состав, значение апобелков, утилизация в тканях, роль липопротеинлипазы.
13. Регуляция депонирования нейтральных липидов в тканях. Нарушения транспорта ТАГ в ткани (дислипотеинемии I, V типов).

Самостоятельная работа

1. Составить схему метаболизма липидов в ходе изучения раздела 5. По теме 5.1 на схеме представить химизм и взаимосвязи путей внешнего обмена и депонирования ТАГ. Приложить к схеме графические представления о транспорте нейтральных жиров.
2. Составить таблицу «Состав и функции транспортных липопротеинов крови» для хиломикронов и липопротеинов очень низкой плотности.

Лабораторная работа 1

Оценка действия липазы. Влияние желчи на активность липазы

Принцип

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

Материал исследования

Панкреатин – источник липазы.

Реактивы

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

Проведение анализа

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

Результаты титрования фиксируют следующим образом:

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

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

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

Расчет

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

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

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

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

Оформление итогов работы

Указывают принцип метода, фиксируют полученные данные, делают расчеты и вывод об активности липазы панкреатина, влиянии желчи на переваривание жиров молока.

Оформление итогов работы

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

Вопросы для самоконтроля

1. Роль жирных кислот в организме. Формулы жирных кислот: масляной, пальмитиновой, стеариновой, олеиновой, линолевой, линоленовой, арахидоновой. Представление о биологически активных производных полиненасыщенной арахидоновой кислоты (простагландины, лейкотриены), их роли.
2. Химические формулы простых и смешанных триацилглицеринов, фосфолипидов (содержащих холин, этаноламин, серин, инозитол). Представление о сфинголипидах (сфингомиелин), гликолипидах (цереброзиды, ганглиозиды)
3. Формулы холестерина, его эфиров, парных желчных кислот, витамина D₃, представление о стероидных гормонах.
4. Переваривание и всасывание липидов, ферменты, организация и значение мицелл, пути ресинтеза липидов в энтероците. Синтез, роль и энтерогепатическая рециркуляция желчных кислот.
5. Методы, позволяющие оценить состояние внешнего обмена липидов.
6. Места синтеза нейтрального жира и организация транспорта триацилглицеролов к местам депонирования, формы транспортных липопротеинов для нейтрального жира, роль липопротеинлипазы.
7. Процесс депонирования нейтральных липидов в тканях, утилизация нейтральных жиров из депо, роль ферментов и гормонов.

ТЕМА 5.2

ТРАНСПОРТ И ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ОБМЕН ПРОСТЫХ И СЛОЖНЫХ ЛИПИДОВ

Актуальность

Триацилглицеролы (ТАГ) или нейтральные жиры – сложные эфиры глицерина и высших жирных кислот. Знание особенностей обмена нейтральных жиров необходимо для понимания патогенеза таких заболеваний, как ожирение, сахарный диабет, атеросклероз. Фосфолипиды и холестерол образуют клеточные мембраны, находятся в составе липопротеинов. При нарушении синтеза фосфолипидов будет нарушаться нормальный метаболизм клеток и образование транспортных липопротеинов, что ведет к многочисленным нарушениям деятельности органов. На фоне нарушений обмена холестерина формируются такие распространенные заболевания как атеросклероз и желчекаменная болезнь.

Знакомство с методами определения в крови общих липидов и их фракций позволяет использовать эти сведения для выявления патологий, связанных с нарушением липидного обмена. Для диагностики заболеваний данных о содержании общих липидов в сыворотке крови недостаточно. Наиболее информативно определение отдельных фракций липидов (нейтральных жиров, фосфолипидов, общего холестерина и холестерина в составе различных липопротеинов) и расчет диагностических индексов и коэффициентов на основе этих результатов.

Цель

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

Вопросы для самоподготовки

1. Основные пути внутриклеточного превращения триацилглицеринов (схема).
2. Значение процесса тканевого липолиза. Химизм утилизации нейтральных жиров из депо, роль ферментов и гормонов (гормоночувствительная ТАГ-липаза, ДАГ- и МАГ-липазы), значение аденилатциклазной системы.
3. Пути использования глицерина, химизм окисления глицерина до CO_2 и H_2O , энергетический выход процесса.
4. Транспорт свободных жирных кислот. Пути использования свободных жирных кислот, образующихся при липолизе и поступающих в кровь.
5. Биологический смысл β -окисления. Химизм окисления жирных кислот до CO_2 и воды, связь с ЦТК и дыхательной цепью, энергетический выход.
6. Пути использования ацетил~КоА. Химизм синтеза кетоновых тел, причины и выраженность кетоза при голодании и сахарном диабете. Химизм утилизации кетоновых тел, роль сукцинил~КоА.
7. Роль липогенеза, пути эндогенного синтеза ТАГ. Синтез жирных кислот и глицерола из глюкозы, включение в состав фосфатидной кислоты, ТАГ. Регуляция, значение процесса, особенности течения в жировой ткани и печени, зависимость от ритма питания.
8. Нарушения обмена ТАГ (ожирение, дислиппротеинемии).
9. Биологическая роль фосфолипидов. Катаболизм фосфолипидов и его значение, ключевые фосфолипазы и их значение.
10. Роль фосфатидной кислоты в синтезе ТАГ, фосфолипидов. Причины и механизмы жирового перерождения печени. Химизм синтеза фосфолипидов в тканях. Липотропные вещества: роль аминокислот, витаминов, липотропные факторы – лекарственные средства.
11. Биологическая роль и пути использования холестерина в организме. Химизм синтеза холестерина до мевалоновой кислоты, получение изопентенилдифосфата, представление о дальнейших этапах синтеза (схема).
12. Строение долихола, понятие о липидных «якорях», их образовании и роли в организме, использование промежуточных метаболитов синтеза холестерина как липидных якорей.
13. Особенности транспорта экзогенного и эндогенного холестерина в организме, формы транспорта, их состав и ферменты. Роль транспортных липопротеинов (ЛПНП и ЛПВП) в обмене холестерина, значение ферментов АХАТ и ЛХАТ, пути выведения холестерина.
14. Нарушения обмена холестерина (гиперлиппротеинемия, атеросклероз, желчекаменная болезнь).

Самостоятельная работа

1. Дополнить схему обмена липидов (см. тему 5.1): по теме 5.2 представить химизм синтеза и направления использования фосфолипидов и холестерина, указать взаимосвязи липидного обмена, выходы на общие пути катаболизма. Приложить графические представления о транспорте холестерина.
2. Дополнить таблицу «Состав и функции транспортных липопротеинов крови» (см. тему 5.1) данными по липопротеинам низкой и высокой плотности.

Темы для реферативных сообщений

1. Липиды в качестве лекарственных препаратов и биологически активных добавок (эссенциале, лецитин, холевая кислота, ω -3-жирные кислоты и др.).
2. Ненасыщенные, полиненасыщенные жирные кислоты, витамин F (структурная роль, участие в обмене фосфолипидов, поведенческих реакциях).
3. Белая, бурая жировая ткань: распределение, роль в организме, особенности метаболизма.
4. Современные представления о роли L-карнитина в организме, участие в пре- и постнатальном развитии.
5. Атеросклероз: причины, механизм развития, последствия, подходы к лечению.

6. Метаболический синдром (синдром X): причины, связь с ожирением, атеросклерозом, сахарным диабетом II типа и гипертензией, основы лечения.
7. Болезни накопления липидов: Нимана-Пика, Тея-Сакса, Гоше, Шюллера-Кристиана, Вольмана. Молекулярные причины, механизмы развития, основы лечения.

Лабораторная работа 1

Определение содержания триацилглицеролов в сыворотке крови

Принцип

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

Реактивы

1) Рабочий реагент (содержит липопротеинлипазу, глицеролкиназу, глицерофосфатоксидазу, пероксидазу, АТФ, ДГБС, 4-аминоантипирин в калиево-фосфатном буфере), 2) стандартный раствор глицерола, эквивалентный концентрации триглицеридов 2,29 ммоль/л.

Материал для исследования

Сыворотка крови.

Проведение анализа

Готовят опытную и стандартную пробы согласно таблице.

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

Расчет

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

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

Нормальные величины

Сыворотка крови до 1,71 ммоль/л

Практическое значение

Триацилглицериды (нейтральные жиры) являются важным показателем в диагностике нарушений липидного обмена (типов дислипидемий (ДЛП)).

Содержание нейтральных жиров в плазме крови повышается при атеросклерозе, ишемической болезни сердца, инфаркте миокарда, сахарном диабете, нефротическом синдроме, панкреатите, жировой инфильтрации печени, эссенциальной семейной гиперлипемии. Снижение концентрации триацилглицеролов в плазме крови наблюдается при гипертиреозе.

Оформление работы

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

Лабораторная работа 2

Определение содержания общего холестерина в сыворотке крови

Принцип

Используется сопряжение ферментативных реакций, катализируемых холестеролэстеразой (гидролизует эфиры холестерина), холестеролоксидазой (превращает свободный холестерол в холестенон с образованием H_2O_2) и пероксидазой (окисляет 4-аминоантипирин пероксидом водорода в присутствии фенола с получением продукта розово-малинового цвета).

Реактивы

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

Материал для исследования

Сыворотка крови.

Нормальные величины

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

Проведение анализа

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

Расчет

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

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

Практическое значение

Гиперхолестеролемиа приводит к раннему развитию атеросклероза и его клинических осложнений - ишемической болезни сердца, инсульта. К нарушениям обмена холестерина относят желчекаменную болезнь. Высокое содержание холестерина в плазме крови выявляется при гиперлипидемиях (типы IIa, IIb и IV), нефротическом синдроме, диабете. Гипохолестеролемиа наблюдается при гипопроотеинемии, циррозе печени, злокачественных опухолях.

Оформление работы

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

Лабораторная работа 3

Определение в сыворотке крови холестерина липопротеинов и индекса атерогенности

Принцип

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

Материал для исследования

Сыворотка крови.

Реактивы

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

Проведение анализа

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

Далее определяют концентрацию холестерина набором реактивов:

в 1-ю пробирку вносят 0,02 мл исходной сыворотки крови (для определения общего холестерина или используют в расчетах данные предыдущей работы), во 2-ю пробирку – 0,02 мл надосадочной жидкости (для определения холестерина ЛПВП), в 3-ю пробирку – 0,02 мл стандартного раствора холестерина, в 4-ю пробирку – 0,02 мл дистиллированной воды (контроль).

Следующие этапы проводят согласно указаниям предыдущей работы.

Расчет

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

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

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

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

Суммарное содержание холестерина ЛПНП и ЛПОНП рассчитывают по формуле:

$$[X_{\text{ЛПНП+ЛПОНП}}] = X_{\text{Общий}} - X_{\text{ЛПВП}}$$

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

$$\text{Индекс атерогенности} = (X_{\text{Общий}} - X_{\text{ЛПВП}}) : X_{\text{ЛПВП}}$$

Нормальные величины

Сыворотка крови

Холестерол ЛПВП		0,9-1,9 ммоль/л
Индекс атерогенности	20-30 лет	2,0-2,8
	более 30 лет	3,0-3,5

Практическое значение

Увеличение концентрации холестерина ЛПВП клинически не значимо, наблюдается при доброкачественных состояниях. Снижение содержания холестерина ЛПВП указывает на

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

Оформление работы

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

Лабораторная работа 4

Экспресс-метод обнаружения кетоновых тел в сыворотке крови и моче

Принцип

Определение кетоновых тел основано на реакции Легалля, учитывающей способность ацетона и ацетоацетата в щелочной среде реагировать с нитропруссидом натрия с образованием комплексов оранжево-красного цвета, превращающихся при подкислении раствора в соединения вишнево-красного, фиолетового цвета (проба более чувствительна к ацетоацетату, чем к ацетону, с β -гидроксимасляной кислотой реакция не идет). Метод полуколичественный, интенсивность развивающейся окраски пропорциональна концентрации кетоновых тел.

Материалы для исследования

Моча нормальная, моча с добавлением ацетона, сыворотка крови.

Реактивы

Диагностические полоски "Кетофан".

Проведение анализа

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

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

Нормальные величины

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

Практическое значение

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

Оформление работы

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

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

Вопросы для самоконтроля

1. Синтез жирных кислот, роль цитрата, малонил-КоА, участие НАДФН, синтазы жирных кислот, значение и регуляция процесса.

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

Тестовые задания

Выбрать один правильный ответ.

1. СТЕРОИДАМИ ЯВЛЯЮТСЯ

- 1) желчные кислоты
- 2) ганглиозиды
- 3) сфингомиелины
- 4) гормоны гипофиза
- 5) гормоны мозгового вещества надпочечников

2. НЕЗАМЕНИМЫМ ФАКТОРОМ ПИТАНИЯ ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) холестерол
- 2) фосфатидилхолин
- 3) линоленовая кислота
- 4) олеиновая кислота
- 5) желчная кислота

3. КАТАБОЛИЗМ ВЫСШИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ПРОИСХОДИТ ПО ПУТИ

- 1) декарбоксилирования
- 2) гликогенолиза
- 3) β -окисления
- 4) липолиза

4. ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ МИТОХОНДРИЙ ОСТАТОК ЖИРНОЙ КИСЛОТЫ ПЕРЕНОСИТ

- 1) карнозин
- 2) карнитин
- 3) креатин
- 4) кератин
- 5) креатинин

5. ИСТОЧНИКОМ НАДФН ДЛЯ СИНТЕЗА ЖИРНЫХ КИСЛОТ ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) пентозофосфатный путь
- 2) катаболизм триацилглицеролов

- 3) окислительное декарбоксилирование пирувата
- 4) гликолиз
- 5) цикл трикарбоновых кислот

6. В СОСТАВЕ ХИЛОМИКРОНОВ ОБНАРУЖИВАЮТ

- 1) около 90 % триацилглицеролов и 2 % белков
- 2) около 50 % холестерина и его эфиров
- 3) около 50 % белков и 20 % холестерина и его эфиров
- 4) около 10 % белков и 50–55 % триацилглицеролов

7. ПРИ ГОЛОДАНИИ КЕТОНОВЫЕ ТЕЛА НЕ ИСПОЛЬЗУЮТСЯ

- 1) нервными клетками
- 2) скелетными мышцами
- 3) кардиомиоцитами
- 4) гепатоцитами

8. ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ГОЛОДАНИИ АКТИВИРУЕТСЯ

- 1) липогенез в жировой ткани
- 2) β -окисление жирных кислот в печени
- 3) синтез холестерина в нервной ткани
- 4) цикл трикарбоновых кислот в печени
- 5) синтез жирных кислот в сердце

9. КЛЮЧЕВУЮ РЕАКЦИЮ СИНТЕЗА ХОЛЕСТЕРОЛА КАТАЛИЗИРУЕТ

- 1) гидроксиметилглутарил-SКоАредуктаза
- 2) ацилтрансфераза
- 3) пируваткиназа
- 4) ацетоацетил-SКоАсинтаза
- 5) оксиметилглутарил-SКоАсинтетаза

10. СИНТЕЗ ЖИРОВ В ЖИРОВОЙ ТКАНИ СТИМУЛИРУЕТ ГОРМОН

- 1) адреналин
- 2) глюкагон
- 3) кортизол
- 4) инсулин
- 5) тироксин

Ситуационные задачи

1. У больного при зондировании двенадцатиперстной кишки установлена задержка оттока желчи из желчного пузыря. *Указать, влияет ли это на переваривание жиров. Пояснить, какие последствия может иметь такая патология.*
2. Содержание триацилглицеролов и фосфолипидов в сердечной мышце в 1,5-2 раза больше, чем в скелетной мускулатуре. *Пояснить биохимический смысл этих различий. Показать, связана с этим высокая чувствительность миокарда к кислородной недостаточности или не связана.*
3. Родители обеспокоены излишним весом ребенка. Не посоветовавшись с врачом, они резко ограничили количество сахара в пище ребенка, увеличив содержание белка, но не уменьшив количество жира. Через несколько недель у ребенка ухудшилось самочувствие, появилась рвота. *Указать, с нарушением какого обмена это связано и почему. Пояснить, какой биохимический анализ подтвердит нарушение этого вида обмена.*

ТЕМА
"ОБМЕН УГЛЕВОДОВ И ЛИПИДОВ. БИОЭНЕРГЕТИКА"
(КОНТРОЛЬНОЕ ЗАНЯТИЕ ПО РАЗДЕЛАМ 3, 4 и 5)

Вопросы для самоподготовки

Биоэнергетика

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

Обмен углеводов

1. Углеводы и их роль в организме. Классификация углеводов по структуре и функциям. Строение основных представителей углеводов: моно-, ди-, полисахариды (пентозы, глюкоза, мальтоза, галактоза, сахароза, крахмал, целлюлоза, гликоген). Представление о структуре гликозаминогликанов (мукополисахаридов): гиалуроновая, хондроитинсерная кислоты, гепарин. Углеводы – лекарственные препараты.
2. Углеводы пищи, переваривание и всасывание. Особенности переваривания в полости рта и тонком кишечнике. Ферменты полостного пищеварения углеводов и пристеночные комплексы. Нарушения функционирования ферментов, последствия.
3. Роль печени в обмене углеводов. Депонирование глюкозы, условия. Взаимопревращения углеводов: метаболизм галактозы и фруктозы в печени и его нарушения.

4. Биосинтез и мобилизация гликогена: последовательность реакций, физиологическое значение. Регуляция активности фосфоорилазы и синтазы гликогена (роль цАМФ, ионов кальция и кальмодулина). Особенности обмена гликогена в печени и в мышцах. Гликогенозы и агликогенозы.
5. Пути превращения глюкозы в тканях. Распад углеводов в анаэробных условиях: гликолиз, гликогенолиз – последовательность реакций, балансовые уравнения, энергетический эффект, способ образования АТФ, локализация процессов. Сходства и отличия гликолиза, гликогенолиза и спиртового брожения. Дальнейшая судьба молочной кислоты.
6. Превращения углеводов в аэробных условиях. Аэробный распад глюкозы: последовательность реакций, энергетический эффект. Биохимические механизмы эффекта Пастера. Роль аэробного распада глюкозы в мозге.
7. Пентозофосфатный путь превращения глюкозы. Химизм окислительной стадии и НАДФН, понятие о реакциях и ферментах системы структурной перестройки. Регуляция процесса, взаимосвязь с гликолизом. Роль пентозофосфатного пути в эритроцитах и лейкоцитах, клетках активно пролиферирующих тканей организма. Наследственная энзимопатия глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы.
8. Биосинтез глюкозы (глюконеогенез): возможные предшественники, последовательность реакций, источники энергии и ферменты. Глюкозо-лактатный цикл (цикл Кори), глюкозо-аланиновый цикл. Значение глюконеогенеза, регуляция глюконеогенеза гормонами.
9. Регуляция концентрации глюкозы в крови. Пути поступления и пути расходования глюкозы крови. Влияние на эти процессы: инсулина, глюкагона, адреналина и глюкокортикоидов. Изменения обмена углеводов при голодании, стрессе и применении глюкокортикоидов (стероидный диабет).
10. Нарушение обмена углеводов при сахарном диабете, типы сахарного диабета. Врожденные нарушения обмена углеводов (галактоземия, гликогенозы, интолерантность к сахарозе, лактозе).

Обмен липидов

1. Липиды, строение, классификация. Разнообразие липидов в организме. Характеристика основных классов липидов: химическая структура смешанных триацилглицеринов, фосфолипидов (фосфатидилхолина, фосфатидилсерина и фосфатидилэтаноламина), холестерина и его эфиров, физико-химические свойства, биологическая роль. Представление о химической структуре сфинголипидов и гликолипидов (цереброзидов, ганглиозидов).
2. Высшие жирные кислоты. Классификация, физико-химические свойства. Источники жирных кислот, биологическая роль, транспорт и использование. Структура масляной, стеариновой, пальмитиновой, олеиновой, линолевой, ω -3 и ω -6 линоленовых, арахидоновой кислот. Производные незаменимых жирных кислот: простагландины и лейкотриены, роль, ключевые ферменты синтеза. Особенности жирных кислот, участвующих в механизмах памяти.
3. Внешний обмен липидов. Пищевые жиры: суточная потребность, переваривание, всасывание. Характеристика мицелл. Роль ферментов и желчных кислот. Синтез и строение таурохолевой и гликохолевой кислот.
4. Ресинтез липидов в стенке кишечника. Хиломикроны - основная транспортная форма пищевых липидов; состав, строение, функции. Утилизация хиломикронов в крови и других тканях. Роль липопротеинлипазы. Депонирование.
5. Биологические нормы содержания общих липидов и триацилглицеринов в крови. Причины и последствия нарушений переваривания и всасывания жиров (гиповитаминозы, стеаторея).
6. Основные пути внутриклеточного превращения триацилглицеринов. Гормональная регуляция (схема). Значение основных гормонов.
7. Липолиз – путь мобилизации и катаболизма нейтральных жиров. Роль процесса. Гормончувствительная липаза, роль аденилатциклазной системы в регуляции ее активности.

Транспорт и использование жирных кислот, образующихся при липолизе. Жирные кислоты и миокард; белки, связывающие жирные кислоты.

8. β -Окисление жирных кислот, связь с ЦТК и дыхательной цепью, распад до углекислого газа и воды и энергетический выход. Другие пути использования ацетил-КоА. Синтез и утилизация кетоновых тел, роль сукцинил-коА и ЦТК. Причины кетоза при голодании и диабете.
9. Химизм синтеза жирных кислот, роль CO_2 , АТФ и НАДФН.
10. Пути получения глицерина и его обмен, направления утилизации, энергетический выход при распаде. Особенности глюконеогенеза из глицерина и синтез глицерина из глюкозы (роль гликолиза). Регуляция процесса инсулином. Нарушения обмена глицерина.
11. Липогенез. Пути эндогенного синтеза триацилглицеринов. Биосинтез жиров в жировой ткани и в печени. Источники глицерина, жирных кислот, энергии.
12. Синтез триацилглицеринов через фосфатидную кислоту. Липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП) – основная транспортная форма триацилглицеринов печени. Состав, строение, функции, утилизация ЛПОНП в крови и тканях. Роль липопротеинлипазы. Регуляция активности фермента.
13. Понятие сложных липидов. Обмен фосфолипидов, фосфолипазы, значение фосфолипаз A_2 и C . Представление о биосинтезе фосфолипидов. Роль аминокислот, витаминов. Источники энергии. Транспортные формы. Нарушение процесса. Липотропные вещества.
14. Холестерол пищи и синтез в организме (до мевалоновой кислоты – химизм, далее – схема с указанием изопентенила, геранила, фарнезила, участия НАДФН), обмен и функции холестерина, роль транспортных липопротеинов в обмене. Направления использования холестерина в организме. Пути выведения холестерина. Нарушение обмена холестерина (атеросклероз, желчекаменная болезнь).
15. Взаимосвязь обмена жиров и углеводов. Схема превращения глюкозы в жиры, степень обратимости процессов. Роль пентозофосфатного пути для синтеза жиров. Влияние гормонов (инсулина, глюкагона, адреналина, глюкокортикоидов) на обмен жиров и углеводов.
16. Ацетил~КоА. Пути образования и пути использования в организме: аэробные превращения глюкозы, жирных кислот, синтез жирных кислот, холестерина, ацетоновых тел.
17. Регуляция обмена липидов. Нарушение обмена липидов: нарушение транспорта из крови в ткани, кетонемия и кетонурия, гиперхолестеринемия, атеросклероз, ожирение, жировая дистрофия печени, гиперлиппротеинемии, наследственные нарушения обмена липидов.

Практическая часть

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

РАЗДЕЛ 6

ОБМЕН БЕЛКОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ. МАТРИЧНЫЕ БИОСИНТЕЗЫ

ТЕМА 6.1

ВНЕШНИЙ ОБМЕН БЕЛКОВ, ГНИЕНИЕ В КИШЕЧНИКЕ И ДЕТОКСИКАЦИЯ В ПЕЧЕНИ

Актуальность

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

Цель

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

Вопросы для самоподготовки

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

Самостоятельная работа

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

Фермент	Место действия	Оптимум рН	Субстратная специфичность

Лабораторная работа 1

Идентификация гистамина солями кобальта

Гистамин играет важную роль в регуляции переваривания белка в желудке. Нейрогуморальная регуляция сокоотделения осуществляется при нахождении пищи в желудке, когда секреция желудочного сока стимулируется за счет вагуса, метасимпатической нервной системы, гастрина, гистамина и питательных веществ (белки, пептиды, аминокислоты). Гистамин является одним из сильнейших стимуляторов желудочной секреции и, в зависимости от дозы, вызывает субмаксимальную и максимальную гистаминовую секрецию. Гистамин в этом качестве используют в медицинской практике при обследовании пациентов гастроэнтерологического профиля (зондирование).

Принцип

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

Реактивы

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

Проведение анализа

Навеску гистамина растворить в 1,0 мл воды, добавить 2-3 капли раствора кобальта нитрата или кобальта хлорида и каплю раствора натрия гидроксида. Выпадает осадок красно-фиолетового цвета.

Оформление работы

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

Лабораторная работа 2

Обнаружение свободной соляной кислоты в желудочном соке при помощи индикаторов

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

Принцип

В присутствии свободной соляной кислоты в желудочном соке индикатор «конго красный» меняет окраску на синюю, оставаясь в нейтральной и щелочной среде красным (зона перехода рН 3,0-5,2). Индикатор п-диметиламиноазо-бензол (ПДААБ), в присутствии свободной HCl имеет красную окраску, в щелочной среде - желтую (зона перехода рН 2,3-4,2).

Реактивы

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

Материалы для исследования

Желудочный сок нормальный и патологический (с разной кислотностью).

Проведение анализа

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

Практическое значение

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

Оформление работы

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

Образец желудочного сока	Изменение окраски индикатора		Величина рН	Заключение
	конго красный	ПДААБ		
Нормальный				
Патологический				

Лабораторная работа 3 **Определение общей кислотности, свободной и связанной соляной кислоты в одной порции желудочного сока**

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

Принцип

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

Реактивы

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

Материалы для исследования

Образцы нормального и патологического (N 1, 2, 3) желудочного сока.

Проведение анализа

В коническую колбу помещают 5 мл исследуемого желудочного сока, добавляют по 2 капли диметиламиноазобензола и фенолфталеина. В присутствии свободной HCl наблюдается красное окрашивание, при её отсутствии – желтое. Титруют 0,1 М раствором NaOH до появления оранжево-красной окраски, отмечают объем (мл), пошедший на титрование свободной HCl – 1 пункт титрования. Продолжают титрование до появления лимонно-желтой окраски, снова отмечают объем щелочи, израсходованной с начала титрования – 2 пункт титрования. Продолжают титрование до появления розовой окраски, отмечают объем щелочи, пошедший на все титрование – 3 пункт титрования.

Все отсчеты делают от нулевой отметки.

Расчет

За единицу кислотности желудочного сока принимают: объем 0,1 М NaOH (мл), необходимый для нейтрализации кислых эквивалентов в 100 мл желудочного сока (титрационные

единицы) или количество миллимолей HCl в 1 л сока. Численно эти величины совпадают (40 TE = 40 ммоль/л).

Пример расчета

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

а) Содержание свободной HCl будет равно:

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

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

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

в) Содержание связанной HCl составит:

$$54 - 40 = 14 \text{ ммоль/л}$$

г) Общая кислотность будет равна:

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

Нормальные величины

Свободная HCl – 20-40 ммоль/л;

связанная HCl – 10-20 ммоль/л;

общая кислотность 40-60 ммоль/л.

Оформление работы

Указывают принцип метода, регистрируют результаты в виде таблицы, производят расчёты, делают вывод о наличии HCl в образцах.

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

Практическое значение

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

Лабораторная работа 4 (теоретически) Беззондовый метод определения кислотности желудочного сока (ацидотест)

Принцип

Введенный в желудок пер ос краситель (2,4-диамино-4-этоксизобензол) освобождается из драже под действием свободной HCl (pH < 3,0). Через 1,5 часа краситель появляется в моче. При подкислении мочи кислотой (25 % раствор HCl) образуется солянокислая соль красите-

ля красного цвета. Сопоставление окраски с приложенной шкалой служит показателем кислотности желудочного сока.

Реактивы

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

Материал для исследования

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

Проведение анализа

Подготовка пациента: после голодания в течение 8 часов и опорожнения мочевого пузыря пациент принимает кофеинбензоат натрия (в 100 мл воды), стимулирующего желудочную секрецию и диурез. Через 1 час собирают «контрольную» мочу. Пациент, не разжевывая, проглатывает драже красителя и через 1,5 часа собирает мочу. Анализируют одновременно обе порции мочи: доводят водой до 200 мл, отбирают по 5 мл разбавленной мочи, добавляют по 5 мл 25 % HCl и сравнивают со шкалой.

Практическое значение

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

Оформление работы

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

Лабораторная работа 5

Обнаружение патологической кислотности желудочного сока

Молочная кислота является конечным продуктом гликолиза, протекающего в анаэробных условиях. При снижении кислотности желудочного сока (гипоацидный гастрит и др. заболевания со снижением синтеза HCl) снижаются его бактерицидные свойства, вследствие чего анаэробная микрофлора, попадающая из полости рта в желудок, оказывается в оптимальных условиях и активно нарабатывает лактат в процессе молочнокислого брожения углеводов.

Принцип

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

Реактивы

1) 1 % раствор фенола, 2) 1 % раствор FeCl₃, 3) 4 % раствор молочной кислоты.

Материал для исследования

Нормальный и патологический желудочный сок.

Проведение анализа

В пробирке готовят раствор фенолята железа из 2,0 мл раствора фенола и 3 капель раствора FeCl₃, смесь разливают поровну в 3 пробирки. Затем в 1 пробирку добавляют 1-2 капли раствора лактата (контроль), во 2 – нормальный желудочный сок, в 3 – патологический. При наличии лактата фиолетовая окраска заменяется зеленовато-желтой, при его отсутствии жидкость обесцвечивается.

Практическое значение

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

Оформление работы

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

Исследуемая проба	Результат	
Желудочный сок	Нормальный	
	Патологический	

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

Принцип

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

Материал для исследования

Образцы нормального и патологического желудочного сока.

Проведение анализа

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

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

Практическое значение

Кровь, кровяные пигменты могут попадать в сок при изъязвлении стенок желудка. Желчные пигменты забрасываются в желудок из 12-перстной кишки вследствие антиперистальтики.

Оформление работы

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

Вопросы для самоконтроля

1. Азотистый баланс и его нарушения. Биоценность белков пищи, нормы белка в питании. Последствия недостаточности и избытка белка в питании.
2. Состав желудочного сока, роль отдельных компонентов – соляной кислоты, ферментов, муцинов. Переваривание белков в желудке у взрослых и детей.
3. Пути активации и специфичность действия протеолитических ферментов желудочно-кишечного тракта. Полостное и пристеночное пищеварение. Эндо- и экзопептидазы, локализация в пищеварительном тракте. Всасывание аминокислот, транспортеры.
4. Метаболизм аминокислот под действием ферментов бактерий толстого кишечника с образованием газов, трупных ядов и других токсичных продуктов распада.
5. Нейтрализация в печени токсичных продуктов распада аминокислот с участием УДФ-ГК и ФАФС.

ТЕМА 6.2

ОБЩИЕ И ЧАСТНЫЕ ПУТИ МЕТАБОЛИЗМА АМИНОКИСЛОТ

Актуальность

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

Цель

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

Вопросы для самоподготовки

1. Основные пути восполнения аминокислот в тканях.
2. Система транспорта аминокислот через клеточные мембраны.
3. Механизм реакций дезаминирования аминокислот. Окислительное дезаминирование. Оксидазы аминокислот. Анаэробная дегидрогеназа глутаминовой кислоты. Строение коферментов.
4. Значение реакций переаминирования. Механизм реакций трансаминирования. Строение аминотрансфераз, коферменты. Клинико-диагностическое значение ферментов трансаминирования – АсАТ и АлАТ.
5. Реакции декарбоксилирования. Строение ферментов, механизм реакций с участием пиридоксальных коферментов, продукты.
6. Получение биогенных аминов, роль в организме. Дальнейшие пути превращения аминов, реакции нейтрализации и участие флавиновых коферментов.
7. Анаболические процессы, в которых участвуют аминокислоты.
8. Знакомство со специфическими путями обмена протеиногенных аминокислот (глицина, серина, метионина, цистеина, фенилаланина, тирозина, триптофана, дикарбоновых аминокислот), патологии при нарушениях обмена.

Темы для рефератов и самостоятельной работы

Используя ответы на поставленные вопросы, дополнить таблицу аминокислот (Приложение 1) и таблицу витаминов (Приложение 2).

1. Основные метаболические превращения фенилаланина и тирозина, ферменты. Реакции синтеза гормонов и медиаторов (катехоламины, тиреоиды) из фенилаланина и тирозина, роль витамина С.

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

Лабораторная работа 1

Определение активности аминотрансфераз сыворотки крови

Актуальность

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

Материал для исследования

Сыворотка крови.

Принцип

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

Реактивы

- 1) 0,1 М фосфатный буфер, рН 7,4, 2) 0,04 % раствор бромтимолового синего, 3) раствор субстрата аспартатаминотрансферазы: смесь 2-оксоглутаровой и аспарагиновой кислот, 4) раствор субстрата аланинаминотрансферазы: смесь 2-оксоглутаровой кислоты и аланина, 5) раствор ДНФГ в 1 М НСl, 6) 0,4 моль/л раствор NaOH, 7) 0,1 мкмоль/л эталонный раствор пиروвиноградной кислоты.

Проведение анализа

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

Принцип

Отдельные аминокислоты обладают различной растворимостью в двух частично смешивающихся жидкостях, одной из которых является вода, другой - водонасыщенный органический растворитель, например, бутанол. Из двух частично смешивающихся жидкостей один растворитель должен быть полярным (неподвижная фаза), а другой неполярным - подвижная фаза. Более гидрофобная аминокислота, лучше растворяющаяся в неполярном растворителе, движется с большей скоростью от линии старта, чем гидрофильная аминокислота. В результате этого отдельные аминокислоты по окончании хроматографического разделения оказываются на разном расстоянии от линии старта.

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

Реактивы

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

Оборудование

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

Проведение анализа

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

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



Рассчитывают по полученной хроматограмме коэффициент распределения R_f для каждой аминокислоты:

$$R_f = \frac{a}{b},$$

Аминокислоты-"свидетели":

(сектор 1) R_f аланина = $\frac{a}{b}$

(сектор 2) R_f лейцина = $\frac{a}{b}$

(сектор 3) R_f глицина = $\frac{a}{b}$

Смесь аминокислот (сектор 4):

1 $R_f = \frac{a}{b}$

2 $R_f = \frac{a}{b}$

3 $R_f = \frac{a}{b}$

где: a - расстояние, пройденное от линии старта аминокислотой (мм),

b - расстояние, пройденное от линии старта фронтом растворителя (мм).

Идентифицируют аминокислоты, находящиеся в исследуемом растворе (сектор 4), путем сравнения их положения (R_f) с положением (R_f) соответствующих аминокислот, используемых в качестве "свидетелей" (сектора 1, 2, 3).

Нормальные значения содержания аминокислот

Плазма крови около 21,42 ммоль/л

Моча до 0,5 г /сут

Практическое значение

Определение свободных аминокислот важно для изучения белкового обмена. Изменения в содержании аминокислот в сыворотке крови и моче наблюдаются при недостаточности печени, усиленном распаде белков, нарушении обмена аминокислот, выделительной функции почек. Недостаток аминокислот (нарушения переваривания белка в желудочно-кишечном тракте, потеря белка при патологии почек и др.) сказывается, в первую очередь, на сердечной мышце, а также может усугублять течение пародонтита и пародонтоза. При врожденных дефектах метаболизма аминокислот увеличивается концентрация в крови и усиливается экскреция с мочой одной или нескольких аминокислот.

Оформление работы

Указывают принцип метода, делают измерения и расчеты по хроматограмме. В выводе поясняют причины разделения аминокислот на хроматограмме, клинико-диагностическое значение оценки аминокислот в сыворотке крови и моче.

Лабораторная работа 3

Реакция Феллинга на обнаружение фенилпирувата в моче

Принцип

Фенилпируват при взаимодействии с $FeCl_3$ образует комплексное соединение оливково-зеленого цвета.

Реактивы

10,0 % раствор $FeCl_3$.

Материал для исследования

Моча.

Проведение анализа

В пробирку вносят 10 капель мочи, 5 капель $FeCl_3$. При наличии в моче фенилпирувата, через 2-3 мин появляется оливково-зеленое окрашивание раствора.

Нормальные величины

Плазма кровидо 1 месяца 75-100 мкмоль/л

от 2 мес до 14 лет 25-75 мкмоль/л

Моча до 1 года 6-24 мкмоль/сут

до 14 лет 6-72 мкмоль/сут

Практическое значение

Фенилкетонурия или фенилпировиноградная олигофрения (слабоумие) связана с врожденным отсутствием в печени фенилаланингидроксилазы, из-за чего нарушается превращение

фенилаланина в тирозин, в крови и моче появляются фенилпируват и фенилаланин. Положительную реакцию Феллинга моча дает обычно после года жизни. До года тест бывает положительным эпизодически (на максимуме выведения фенилкетонов), поэтому при подозрении на фенилкетонурию его повторяют неоднократно. В крови повышается концентрация фенилаланина в десятки раз (до 600-2400 мкмоль/л), в моче до 3-12 мкмоль/сут. Фенилпируват появляется в моче также при поражениях печени (вирусный гепатит, отравление ядами).

Оформление работы

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

Вопросы для самоконтроля

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

ТЕМА 6.3

ОБЕЗВРЕЖИВАНИЕ АММИАКА В ОРГАНИЗМЕ

Актуальность

Аммиак является высокотоксичным веществом. При катаболизме аминокислот (70 г в сутки) и окислении биогенных аминов образуется большое количество NH_3 , но его уровень в крови не превышает 60 мкмоль/л (3 ммоль/л для кроликов – летальная доза). Основной транспортной связанной формой аммиака служит глутамин, при повышении концентрации аммиака дополнительно активизируется синтез аспарагина, в транспорте аминного азота мышц участвует аланин. NH_3 связывается в тканях с образованием нетоксичных соединений, выделяемых с мочой – мочевины, соли аммония, креатинин. Из состава транспортных форм NH_3 может быть направлен на синтез азотистых оснований, при катаболизме которых он образуется снова и выводится из организма в виде конечных продуктов распада, в том числе – мочевой кислоты. В клинике часто выявляются нарушения процессов нейтрализации NH_3 .

Цель

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

Вопросы для самоподготовки

1. Основные пути образования аммиака. Источники аммиака в тканях.
2. Токсичность аммиака, влияние на мозг, клеточное дыхание и торможение цикла трикарбоновых кислот. Влияние аммиака на организм при избыточном белковом питании.
3. Пути связывания аммиака в организме. Пути, нацеленные на прямую детоксикацию аммиака и выведение из организма конечных продуктов азотистого обмена. Пути, использующие аммиак для синтеза необходимых организму метаболитов с последующим выведением N-содержащих продуктов их распада.

4. Механизм синтеза глутамина – транспортной формы аммиака. Роль аланина в транспортировке аминного азота из работающих мышц в печень (аланиновый цикл).
5. Орнитиновый цикл мочевинообразования, связь с циклом Кребса, источники аммиака для синтеза.
6. Аммонийогенез в почках.
7. Образование креатина и креатинина. Локализация, роль активной формы метионина. Значение креатинфосфокиназы и креатинфосфата для мышечной ткани.
8. Возможные механизмы нарушения образования конечных продуктов белкового обмена.
9. Клинико-диагностическое значение определения мочевины, креатинина в сыворотке крови и моче.

Лабораторная работа 1

Определение содержания мочевины в сыворотке крови и моче

ДИАЦЕТИЛМОНООКСИМНЫЙ МЕТОД

Принцип

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

Реактивы

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

Материал для исследования

Сыворотка крови, моча (разведение 1:50)

Проведение анализа

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

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

Расчет

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

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

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

Нормальные величины

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

ЭКСПРЕСС МЕТОД С ПРИМЕНЕНИЕМ ИНДИКАТОРНЫХ ПОЛОСОК

Принцип

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

Реактивы

Индикаторная бумага «Уреатест» или «Уранал».

Материал для исследования

Сыворотка крови

Проведение анализа

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

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

Практическое значение

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

Оформление работы

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

Вопросы для самоконтроля

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

Тестовые задания

Выбрать один правильный ответ.

1. БИОЛОГИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ БЕЛКОВ ОБУСЛОВЛЕНА

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

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

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

3. ЭНТЕРОПЕПТИДАЗА ЯВЛЯЕТСЯ АКТИВАТОРОМ ФЕРМЕНТА

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

4. АКТИВНЫЙ ФЕРМЕНТ ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗА СОДЕРЖИТ

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

5. СЕРОТОНИН В РЕАКЦИИ ДЕКАРБОКСИЛИРОВАНИЯ ОБРАЗУЕТСЯ ИЗ

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

6. ОБРАЗОВАНИЕ γ -АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ КАТАЛИЗИРУЕТ

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

7. В СОСТАВ АМИНОТРАНСФЕРАЗЫ ВХОДИТ КОФЕРМЕНТ

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

8. СИНТЕЗ СОЛЯНОЙ КИСЛОТЫ В ЖЕЛУДКЕ СТИМУЛИРУЕТ

- 1) тирамин
- 2) гистамин
- 3) дофамин
- 4) триптамин
- 5) ГАМК

9. ПРИ ГИПОВИТАМИНОЗЕ С НАРУШЕН ОБМЕН АМИНОКИСЛОТЫ

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

10. СВЯЗЫВАНИЕ АММИАКА ПРОИСХОДИТ ПРИ

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

Ситуационные задачи

Ответы подробно пояснить.

1. Больного беспокоят боли в области желудка, отрыжка с неприятным запахом «тухлых яиц», урчание и газообразование в кишечнике. *Указать, какие процессы могут быть причиной появления такого запаха. Дать рекомендации для нормализации процессов пищеварения.*
2. У больного при поступлении в стационар жалобы на аллергические явления. *Указать, содержание какого биогенного амина и активность какого фермента целесообразно определить. Пояснить, что является предшественником этого амина.*
3. У ребёнка содержание в крови фенилаланина 5 мкмоль/л при норме 0,2 мкмоль/л, он выделяется в большом количестве с мочой. *Пояснить, какие процессы обмена нарушены, как называется заболевание и как вскармливать ребёнка.*
4. Накопление аммиака в клетках мозга является непосредственной причиной нарушения психического состояния при циррозах печени. Причиной токсического действия аммиака считают вторжение его в энергетический метаболизм клетки. *Пояснить возможный механизм токсического действия аммиака.*

РАЗДЕЛ 7

ОБМЕН НУКЛЕОТИДОВ, НУКЛЕОПРОТЕИНОВ. МАТРИЧНЫЕ БИОСИНТЕЗЫ

ТЕМА 7.1

ОБМЕН НУКЛЕОТИДОВ, НУКЛЕОПРОТЕИНОВ

Актуальность

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

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

Цель

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

Вопросы для самоподготовки

1. Переваривание нуклеопротеинов и васывание продуктов их распада в желудочно-кишечном тракте. Катаболизм нуклеиновых кислот в клетке.
2. Реакция образования 5-фосфорибозиламина, источники атомов азота и углерода пуринового кольца при синтезе ИМФ. Основные этапы синтеза АМФ и ГМФ из ИМФ, превращение нуклеозидмонофосфатов в трифосфаты.
3. Реакции синтеза УМФ и ЦМФ, превращение их в трифосфаты, нарушение метаболизма пиримидинов при оротацидурии.
4. Образование дезоксирибонуклеотидов, роль тиоредоксина и НАДФН в этом процессе, связь с фазами клеточного цикла.
5. Синтез дГМФ, ферменты, катализирующие процесс, роль метилен-ТГФК.
6. Регуляция синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов по типу обратной связи, ее особенности.
7. Реакции образования мочевой кислоты из АМФ и ГМФ, содержание мочевой кислоты в крови и моче.
8. Молекулярные механизмы развития мочекаменной болезни, синдрома Леша-Нихана, подагры. Диета при гиперурикемии, причины эффективности аллопуринола при лечении подагры.

9. Распад пиримидиновых нуклеотидов, конечные продукты процесса, их утилизация и судьба. Отличительные особенности распада пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов.
10. Ингибиторы синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Нуклеотиды - лекарственные препараты.
11. Нуклеотидные коферменты, представление об их образовании. Нуклеотиды как активаторы метаболитов в реакциях обмена веществ.
12. Биосинтез ДНК: суммарное уравнение репликации, система синтеза ДНК, ориджин репликации, ферменты репликации, основные этапы и особенности репликации на разных нитях ДНК, ошибки и репарация ДНК.
13. Связь биосинтеза ДНК с фазами клеточного цикла. Локализация синтеза ДНК в клетке: ядро и митохондрии. Синтез ДНК при репликации и феномен обратной транскрипции. Теломераза.
14. Созревание молекул ДНК (смысл метилирования нуклеотидов и др.). Организация нуклеопротеинов при формировании хромосом, взаимодействие ДНК с гистонами, механизмы упаковки в хромосомы.

Самостоятельная работа

Заполнить столбец «Репликация» таблицы матричных биосинтезов.

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

Лабораторная работа 1

Определение содержания мочевой кислоты в сыворотке крови и моче

ТИТРОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД (ОЦЕНКА В МОЧЕ)

Принцип

Мочевая кислота восстанавливает фосфорновольфрамный реактив с развитием синей окраски, интенсивность которой пропорциональна количеству мочевой кислоты. Количество образовавшейся фосфорновольфрамной сини определяют титрованием гексацианоферратом калия, который окисляет фосфорновольфрамную синь и окраска исчезает.

Реактивы

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

Материал для исследования

Моча.

Проведение анализа

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

Расчет

$$C_{\text{ОП}} = \frac{C_{\text{ст}} \cdot V_{\text{А}} \cdot V_{\text{Д}}}{V}$$

где $C_{\text{оп}}$ – концентрация мочевой кислоты в пробе, $C_{\text{ст}}$ – концентрация стандартного раствора мочевой кислоты (соответствует 1 мл раствора $K_3[Fe(CN)_6]$ – 0,004 моль), V - взятый для анализа объем мочи, A – количество пошедшего на титрование раствора $K_3[Fe(CN)_6]$ (мл), D – суточный диурез (1200-1500 мл).

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ МЕТОД (ОЦЕНКА В КРОВИ И МОЧЕ)

Ферментативным методом можно определять концентрацию мочевой кислоты в плазме крови, сыворотке крови и моче.

Принцип

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

Материал для исследования

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

Реактивы

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

Проведение анализа

	Опыт 1, мкл	Опыт 2, мкл	Стандарт, мкл
Сыворотка крови	50	-	-
Моча	-	50	-
Стандарт мочевой кислоты	-	-	50
Рабочий реагент	2000	2000	2000
Инкубируют 10 мин при 37°C. Измеряют экстинкцию стандартной и опытных проб против рабочего реагента при длине волны 520(500-540) нм в кювете 0,5 см.			

Расчет

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

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

где $E_{\text{оп}}$ - оптическая плотность пробы, $E_{\text{ст}}$ - оптическая плотность стандарта, $C_{\text{ст}}$ - концентрация стандартного раствора (калибратор), V - объем суточной мочи (л), 5 - коэффициент разведения мочи, 1000 - коэффициент пересчета мкмоль в ммоль.

Нормальные величины

Сыворотка и плазма крови

женщины 150-310 мкмоль/л

мужчины 230-500 мкмоль/л

Моча 1,5-4,5 ммоль/сут

Практическое значение

Содержание мочевой кислоты в крови (мононатриевая соль в комплексе с белком) определяется интенсивностью ее синтеза организмом и выделением с мочой. Повышение содержания мочевой кислоты (гиперурикемия) наблюдается при уменьшении выведения ее почками или избыточном образовании при всех заболеваниях, связанных с распадом нуклеопротеинов (лейкозы, лечение цитостатиками, облучение). У таких больных отмечается образование мо-

чевых камней. Гиперурикемия является главным симптомом подагры, когда мочевая кислота откладывается в тканях, суставных сумках, хрящах, сухожилиях, а суточное количество в моче снижается. Белки сыворотки стабилизируют ураты, но при снижении рН мочевая кислота кристаллизуется в тканях. Гиперурикемия является компонентом метаболического Х-синдрома. Гипоурикемия отмечается при анемии, приеме салицилатов, кортикотропина. Гиперурикурия (увеличение экскреции уратов) наступает при воздействии солей лития. Гипоурикурия (уменьшение экскреции мочевой кислоты) может быть следствием отравления солями тяжелых металлов, заболеваний почек, употребления алкоголя.

Оформление работы

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

Вопросы для самоконтроля

1. Превращение нуклеопротеинов в желудочно-кишечном тракте, в клетках организма.
2. Биосинтез пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, дезоксирибонуклеотидов и регуляцию этих процессов.
3. Распад пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Сравнение молекул – источников атомов для синтеза азотистых оснований и конечных продуктов их распада. Мочевая кислота, роль в организме, подагра.
4. Значение нуклеотидов в процессах обмена веществ. Роль нуклеотидов в биосинтезе нуклеиновых кислот.
5. Хранение информации о белке, генетический код, принципы синтеза ДНК. Механизмы и ферменты репликации, исправление ошибок, теломераза, созревание и упаковка ДНК.

ТЕМА 7.2

БИОСИНТЕЗ БЕЛКА И ЕГО РЕГУЛЯЦИЯ

Актуальность

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

Цель

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

Вопросы для самоподготовки

1. Строение транскриптона ДНК, экзоны и интроны. Генетический код, его свойства.
2. Этапы и ферменты транскрипции. Кэпирование, полиаденилирование, процессинг матричной РНК. Особенности процессинга транспортной и рибосомальной РНК.
3. Основные компоненты белоксинтезирующей системы.
4. Адапторная роль транспортной РНК. Синтез аминоацил-тРНК, специфичность аминоацил-тРНКсинтетазы.
5. Строение и функционирование рибосом. Последовательность реакций при синтезе полипептидной цепи.
6. Регуляция биосинтеза белка путем индукции и репрессии (схема Жакоба-Моно).
7. Посттрансляционная модификация белковых молекул. Значение.

8. Возможность нематричного образования пептидной связи, ферменты и значение при синтезе важнейших пептидов (на примере синтеза/распада глутатиона в процессе транспорта аминокислот в клетку).
9. Лекарственные препараты – активаторы и ингибиторы матричных синтезов.
10. Современные методы оценки экспрессии генов (ИФА, ПЦР и другие).

Темы для реферативных сообщений

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

Самостоятельная работа

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

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

Лабораторная работа 1

Определение содержания общего белка в сыворотке крови

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

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

Материал для исследования

Сыворотка крови.

МИКРОБИУРЕТОВЫЙ МЕТОД

Принцип

Белки и пептиды в щелочной среде способны формировать с медью фиолетовый или красно-фиолетовый комплекс, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию белка

Реактивы

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

Проведение анализа

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

Расчет

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

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

Нормальные величины

Сыворотка крови 63-85 г/л

Клинико-диагностическое значение

Изменения концентрации общего белка могут быть абсолютными и относительными. Изменения абсолютного характера являются следствием колебаний содержания белка в крови. Относительные изменения зависят от объема крови.

Гипопротеинемия чаще всего связана с уменьшением фракции альбуминов. *Истинная (абсолютная) гипопротеинемия*: недостаточное потребление белка с пищей (заболевания желудочно-кишечного тракта, сужение пищевода при опухолях, недоедание, голодание); снижение синтеза белка (несбалансированный состав белков пищи, хронические паренхиматозные гепатиты, интоксикации, злокачественные новообразования, лечение кортикостероидами); усиленный распад белка (кахекия, тяжелые инфекции, длительные воспалительные процессы, лихорадочные состояния, тиреотоксикоз), потеря белка (нарушения проницаемости капилляров, кровоизлияния, ожоги, острые и хронические кровотечения). *Относительная гипопротеинемия*: гипергидратация (нарушения водного баланса). *Истинная гиперпротеинемия*: острые инфекции (увеличение синтеза белков острой фазы), хронические процессы (активация иммунной системы с развитием γ -глобулинемии) – миеломная болезнь, лимфогрануломатоз, саркоидоз. *Относительная гиперпротеинемия*: обезвоживание с потерей внутрисосудистой жидкости при профузных поносах (холера и др.), усиленном потоотделении, неукротимой рвоте, несахарном диабете, тяжелых и обширных ожогах, генерализованных перитонитах.

Оформление работы

Указывают принцип метода, регистрируют показания приборов, делают расчеты. Сравнивают полученные данные с нормальными величинами, делают вывод по возможным заболеваниям.

Лабораторная работа 2

Современные методы оценки экспрессии генов (теоретически)

В современном мире интенсивно развиваются ДНК-технологии (наиболее известен ПЦР-анализ) и иммунобиохимические методы, используемые при изучении фундаментальных проблем протеомики, метаболомики, иммунологии, эндокринологии, генетики и при решении практических задач медицины, требующих точной оценки экспрессии белков, содержания биологически активных веществ или идентификации возбудителя заболевания.

Использование современных методов требует наличия в лабораториях специальной аппаратуры и строгого соблюдения технологических процессов, что не всегда возможно воспроизвести в условиях учебных аудиторий. Однако базовые знания передовых биомедицинских технологий необходимы современному специалисту, поэтому на практических занятиях предоставлена возможность ознакомиться с основами наиболее актуальных методов. К наиболее востребованным относится иммуноферментный анализ (ИФА) – это одновременно фотоколориметрический и иммунохимический метод. Использование ИФА-тест-систем в практическом здравоохранении способствует разностороннему системному подходу к обследованию пациента на этапах установления диагноза, уточнения молекулярных механизмов и динамики заболевания, проверки эффективности лечения, в том числе при патологии соединительной и костной тканей, широко представленных в полости рта.

1) ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ

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

Этапы проведения анализа

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

2 этап. При выполнении анализа лунки заполняют исследуемым материалом (сыворотка крови), нанося его в разные лунки с дробным разбавлением ($1/2$, $1/4$, $1/8$, $1/16$, $1/32$ и т.д.), затем выдерживают около 30 мин для связывания. Если в образцах имеются антитела, комплементарные нанесённому антигену, они образуют с ним прочные комплексы. После удаления образцов лунки трехкратно промывают буфером для удаления остатков несвязавшегося материала.

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

4 этап. Лунки заполняют раствором субстрата, который в течение 1 ч превращается в окрашенный продукт под действием конъюгированного фермента. Реакцию останавливают добавлением кислоты. Чувствительность ИФА высока благодаря «усилению сигнала» на конъюгированном ферменте. Каждая молекула исследуемого антитела связывает 1 молекулу фермента, катализирующую превращение десятков и сотен тысяч молекул субстрата в цветной продукт. Субстратом для конъюгатов, связанных с пероксидазой хрена, является ортофенилендиамин в смеси с H_2O_2 , что даёт оранжево-коричневые растворы, поглощающие свет

при 492 нм. Субстрат щелочной фосфатазы (п-нитрофенилфосфат) преобразуется в п-нитрофенол, поглощающий свет при 405 нм.

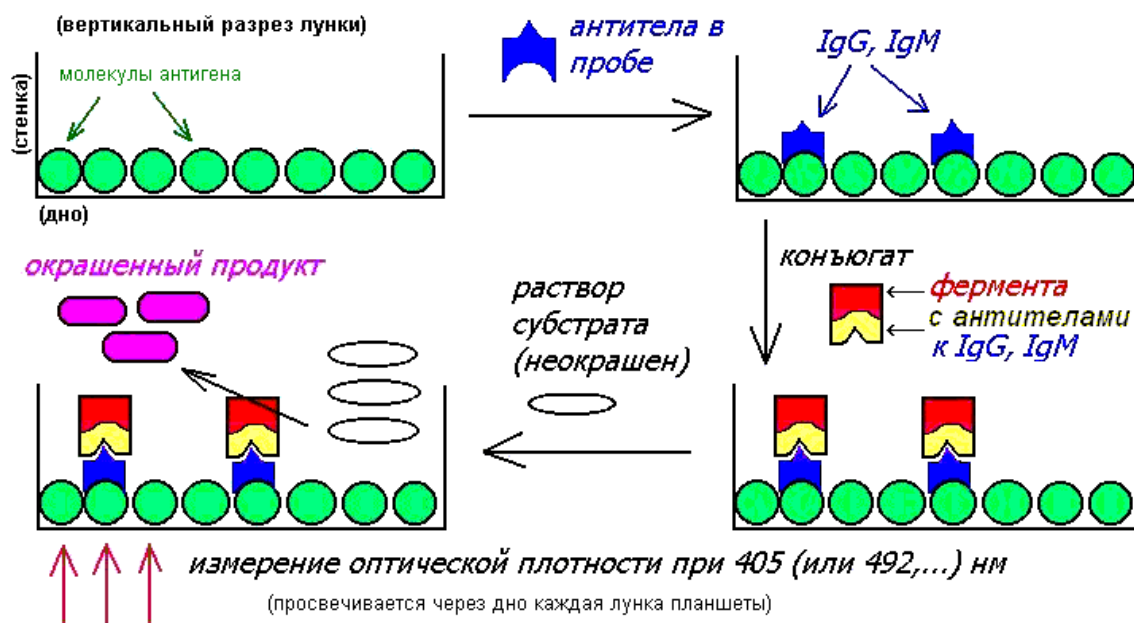


Схема процедуры проведения иммуноферментного анализа

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

В ряде случаев, чтобы подтвердить отсутствие антител, наряду с процедурой ИФА требуется проведение ПЦР-анализа (см. ниже по тексту), например, донорскую кровь оценивают на наличие вируса СПИД, возбудителей ряда других заболеваний. Дело в том, что в первые дни после заражения число антител к патогену в крови может оказаться настолько малым, что иммуноферментный анализ часто даёт так называемую «серонегативную реакцию», то есть не идентифицирует специфические антитела при имеющемся возбудителе.

2) ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОЕ И ИММУНОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Иммунофлуоресцентный анализ или тест на флуоресцирующие антитела (Immunofluorescence Assay (IFA), Fluorescent Antibody Test (FAT)) – одна из наиболее простых диагностических процедур.

Этапы проведения анализа

На плёнку наносят исследуемый образец (сыворотку или плазму крови и др.), который содержит или не содержит искомые антигены (специфические белки, антигены возбудителя подозреваемой патологии и др.).

Для выявления антигенов на ту же плёнку наносят раствор антител к этому антигену, конъюгированных (т.е. связанных ковалентно) с молекулами флуоресцирующего соединения, которое выступает в роли маркера, удобного для обнаружения.

Плёнку выдерживают в растворе антител некоторое время, достаточное для связывания антител с антигенами (если таковые имелись в образце), после чего избыток несвязавшихся антител смывают буфером, а плёнку рассматривают на флуоресцентном микроскопе. Если в образце присутствовал антиген патологии, то с ним будут прочно связаны молекулы меченых флуоресцеином антител, под микроскопом можно наблюдать зелёное окрашивание.


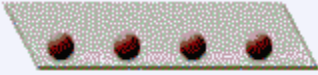
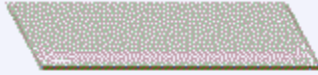

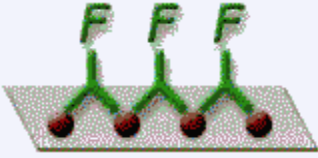
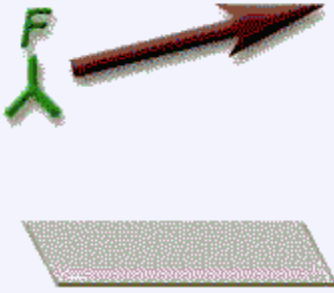

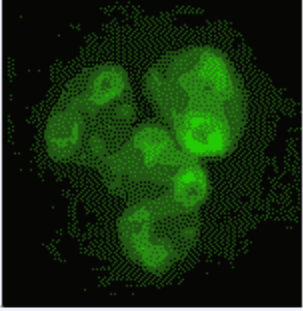
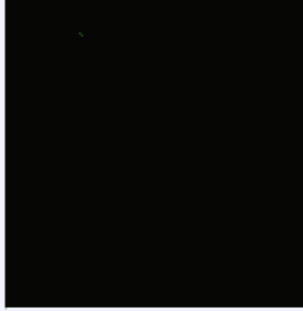
<p>реагенты: неизвестный образец закрепляется на пленке (может содержать искомые антигены-</p> <p style="text-align: center;"> Ag</p>	<p>ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ образец</p> <p>Ag присутствует на пленке</p> 	<p>ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ образец</p> <p>Ag отсутствует на пленке</p> 
<p>реагенты: меченные флуоресцеином антитела к искомому антигену (дается время для протекания реакции связывания) несвязавшиеся антитела смывают</p> <p style="text-align: center;"></p>		
<p>ПРОЦЕДУРА: наблюдение под флуоресцентным микроскопом</p> <p style="text-align: center;"></p> <p>РЕЗУЛЬТАТ: ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ- зеленая флуоресценция ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ- отсутствие флуоресценции</p>		

Схема проведения иммунофлуоресцентного анализа

Иммуногистохимические исследования похожи на иммунофлуоресцентный анализ. Главное отличие метода состоит в наличии биохимической составляющей вместо флуоресцентной метки. Кроме диагностики клеток крови, такие исследования полезны при оценке срезов тканей, культур клеток.

Особенности проведения анализа

Контрольные антитела к антигену выявляемой патологии в случае иммунохимического анализа конъюгированы не с флуоресцентным маркером, а с белком-ферментом (пероксидаза хрена или щелочная фосфатаза). После сорбции меченых антител на возможных молекулах антигена в составе биообъекта добавляют раствор субстрата для ферментативной реакции. Единственная молекула белка-фермента катализирует превращение десятков и сотен тысяч молекул неокрашенного субстрата в окрашенные продукты, усиливая «сигнал» и повышая чувствительность анализа. После остановки реакции появляются цветные окрашенные полосы в местах нахождения антигена.

3) ДНК-ДИАГНОСТИКА ЗАБОЛЕВАНИЙ

Достижения в области биохимии и молекулярной биологии меняют возможности коррекции различных патологических процессов. Доказана взаимосвязь между изменениями структуры ДНК и рядом заболеваний. Идентификация генов, нарушение работы которых приводит к развитию наследственных заболеваний, создала предпосылки для развития эффективных методов их коррекции, лечения и профилактики. На основе представлений об экспрессии генов, реализуемой в виде белкового продукта, разработаны новые способы диагностики и лечения заболеваний. С помощью генной терапии оказалось возможным встраивать полно-

ценно работающие гены в клетки организма и восстанавливать метаболические нарушения, вызванные мутантными генами. Для выявления дефектов в структуре ДНК, ее нужно выделить (сначала из биологической жидкости, биоптата или культуры клеток, затем непосредственно из структуры клеток) и «наработать» в таком количестве, которого будет достаточно для лабораторного исследования. При использовании с целью терапии гены должны быть выделены для введения их в дефектные клетки организма. *Основные методы, используемые в ДНК-диагностике заболеваний:* выделение ДНК, расщепление ДНК, идентификация специфических последовательностей ДНК, блот-гибридизация ДНК, секвенирование ДНК (установление первичной структуры фрагментов), получение рекомбинантных ДНК и их амплификация (умножение).

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

Принцип метода

Методология ПЦР-исследований заключается в идентификации специфического участка молекулы ДНК с последующим его копированием (амплификацией *in vitro*) с целью получения достаточного количества копий, которые можно выявить доступными методами детекции. Метод ПЦР позволяет избирательно синтезировать участки ДНК длиной от нескольких десятков до нескольких сотен пар нуклеотидов, используя в качестве матрицы любые образцы ДНК. За несколько часов можно выделить и размножить последовательность ДНК в количествах, превышающих исходные в 10^8 раз.

Необходимое оборудование

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

Реактивы для ПЦР-диагностики

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

Материал для исследования

Образец ДНК или РНК.

Этапы проведения анализа

Амплификация заключается в повторении циклов, представляющих собой трехступенчатый процесс, протекающий при разных температурах.

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

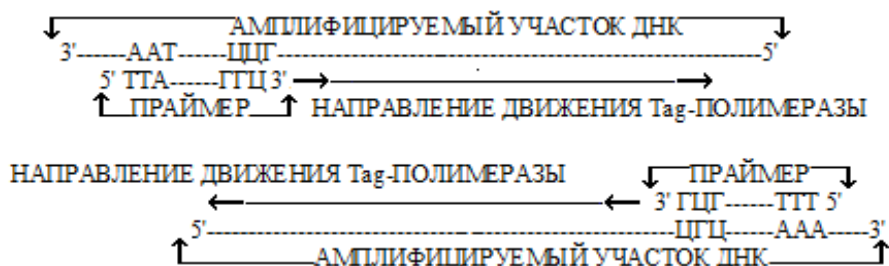


Схема гибридации ДНК с праймерами

2) *Гибридизация ДНК с праймерами* – отжиг праймеров с комплементарными последовательностями. Специфическая гибридизация цепей ДНК с праймерами протекает при 30-60°C. При амплификации с помощью ПЦР используют 2 олигонуклеотидных праймера (затравки), фланкирующих участок ДНК, специфичный для определяемого возбудителя. Искусственно синтезированные для ПЦР праймеры представляют собой олигодезоксирибонуклеотиды (длиной около 20-30 остатков нуклеотидов). Для синтеза праймеров необходимо знать первичную структуру (последовательность нуклеотидов) амплифицируемой области ДНК. Праймеры должны быть комплементарны 3'-концам амплифицируемого участка.

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

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

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

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

Вопросы для самоконтроля

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

Тестовые задания

Выбрать один правильный ответ.

1. ДОНОРОМ УГЛЕРОДА В СИНТЕЗЕ ПУРИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) аспарагиновая кислота
- 2) формил-ТГФК
- 3) глутамин
- 4) триптофан

2. РЕГУЛЯТОРНЫМ ФЕРМЕНТОМ СИНТЕЗА ПИРИМИДИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) ксантиноксидаза
- 2) карбамоилфосфатсинтетаза II
- 3) дигидрооротаза
- 4) карбамоилфосфатсинтетаза I

3. ЭФФЕКТИВНОСТЬ АЛЛОПУРИНОЛА ПРИ ЛЕЧЕНИИ ПОДАГРЫ ОСНОВАНА НА

- 1) конкурентном ингибировании ксантиноксидазы
- 2) понижении концентрации гипоксантина в моче
- 3) увеличении скорости выведения мочевой кислоты почками
- 4) уменьшении скорости образования пуриновых оснований

4. К РАЗВИТИЮ ОРОТАЦИДУРИИ ПРИВОДИТ ДЕФЕКТ ФЕРМЕНТА

- 1) карбамоилфосфатсинтетаза I
- 2) карбамоилфосфатсинтетаза II
- 3) ксантиноксидаза
- 4) ОМФ-декарбоксилаза

5. КОНЕЧНЫМ ПРОДУКТОМ РАСПАДА ПУРИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) мочевины
- 2) мочевая кислота
- 3) молочная кислота
- 4) малоновая кислота

6. ПРАВИЛЬНОЙ ХАРАКТЕРИСТИКОЙ СВОЙСТВ БИОЛОГИЧЕСКОГО КОДА ЯВЛЯЕТСЯ ПОЛОЖЕНИЕ:

- 1) каждому кодону соответствует до трех аминокислот
- 2) одну аминокислоту могут кодировать несколько триплетов
- 3) каждой аминокислоте соответствует только один кодон
- 4) кодоны м-РНК считываются в направлении от 3' к 5' концу

7. ДЛЯ ПРОЦЕССА ТРАНСКРИПЦИИ МАТРИЦЕЙ ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) ДНК
- 2) мРНК
- 3) тРНК
- 4) рРНК

8. ДЛЯ РЕАКЦИЙ ТРАНСЛЯЦИИ НЕОБХОДИМО НАЛИЧИЕ

- 1) лизосом
- 2) РНК-полимеразы

- 3) м-РНК
- 4) АТФ

9. ДЛЯ ОБРАЗОВАНИЯ ПЕПТИДНЫХ СВЯЗЕЙ ПРИ СИНТЕЗЕ БЕЛКА НЕОБХОДИМА

- 1) аминоксил-т-РНК синтетаза
- 2) пептидилтрансфераза
- 3) транслоказа
- 4) карбоксипептидаза

10. РАЗЛИЧИЯ ФЕНОТИПА ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ МНОГОКЛЕТОЧНЫХ ОБУСЛОВЛЕННЫ

- 1) стойкой репрессией отдельных генов
- 2) аллостерическим ингибированием различных ферментов
- 3) различиями в наборе ДНК
- 4) различиями в посттрансляционной модификации белков

Ситуационные задачи

1. Ребенок в возрасте 1 года поступил в детскую больницу с явлениями отсталости физического и умственного развития. При исследовании мочи выявлена высокая концентрация мочевой кислоты. *Пояснить причину ее появления.*
2. При недостатке в рационе фолиевой кислоты развиваются мегалобластическая анемия, лейкопения, нарушается состояние слизистых оболочек и кожи. *Пояснить биохимическую причину таких нарушений.*
3. В кодоне 5'-ГАА-3' информационной РНК, ответственной за синтез β -полипептидной цепи гемоглобина, обнаружено замещение последнего аденилового нуклеотида на уридиловый. Указать, результатом чего стала такая замена. *Пояснить, к каким метаболическим последствиям и какому заболеванию она приводит и почему.*
4. Противоопухолевый препарат цисплатин является ингибитором ферментов топоизомераз. *Пояснить, каким образом ингибирование влияет на опухолевые клетки.*

ТЕМА

ОБМЕН БЕЛКОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ. МАТРИЧНЫЕ БИОСИНТЕЗЫ (КОНТРОЛЬНОЕ ЗАНЯТИЕ ПО РАЗДЕЛАМ 6 И 7)

Вопросы для самоподготовки

Обмен аминокислот и белков. Аммиак

1. Баланс азота в организме. Понятие азотистого равновесия. Биологическая ценность белка. Заменяемые и незаменимые аминокислоты. Принципы составления рационов питания.
2. Переваривание белков в желудочно-кишечном тракте. Основные ферменты. Активация проферментов, специфичность и механизм действия, локализация в желудочно-кишечном тракте. Нарушения внешнего обмена белков.
3. Желудочный сок, его основные компоненты. Механизм синтеза соляной кислоты, ее биологическая роль. Понятие кислотности желудочного сока.
4. Гниение белков в кишечнике, биологическая роль процесса. Механизмы обезвреживания продуктов гниения. Строение и функции УДФГК и ФАФС.
5. Дезаминирование, его виды. Строение ферментов. Глутаматдегидрогеназа, механизм функционирования, регуляция активности, биологическая роль.
6. Механизмы трансаминирования. Строение ферментов, роль витамина В₆. Клинико-диагностическое значение теста определения активности аминотрансфераз в плазме крови.

7. Трансдезаминирование (непрямое дезаминирование), этапы, роль в метаболизме. Глюко- и кетогенные аминокислоты. Ацетил~КоА и другие ключевые молекулы путей использования продуктов дезаминирования аминокислот.
8. Пути превращения аминокислот в тканях до конечных продуктов: CO₂, H₂O, NH₃. Энергоэффект окисления аланина, глутамата, аспартата.
9. Декарбоксилирование аминокислот. Строение ферментов. Роль витамина В₆. Биологическая роль аминов - гистамина, γ-аминомасляной кислоты, серотонина. Ферментные системы инактивации биогенных аминов.
10. Пути образования и утилизации аммиака в тканях. Гипераммониемии.
11. Синтез амидов. Роль глутамина, других аминокислот в транспорте аммиака.
12. Механизм синтеза мочевины. Реакции орнитинового цикла, ферменты, компартиментализация в клетке, энергетический эффект процесса.
13. Аммиониогенез. Локализация и роль процесса.
14. Синтез креатина, креатинфосфата, креатинина. Роль креатинфосфата.
15. Метаболизм глицина и серина, фенилаланина и тирозина, глутамата и аспартата, серосодержащих аминокислот.

Обмен нуклеотидов, матричные биосинтезы

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

Практическая часть

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

РАЗДЕЛ 8

РЕГУЛЯЦИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ. РЕГУЛЯТОРНЫЕ МОЛЕКУЛЫ И КЛЕТОЧНАЯ МЕМБРАНА

ТЕМА 8.1

ИЕРАРХИЯ СИСТЕМ РЕГУЛЯЦИИ. ГОРМОНЫ

Актуальность

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

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

Цель

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

Вопросы для самоподготовки

1. Иерархия регуляторных систем организма. Принципы регуляции обменных процессов. Роль ЦНС, гипоталамо-гипофизарная система. Механизм обратной отрицательной связи в регуляции синтеза и действия гормонов. Понятие о системах межклеточной коммуникации: эндо-, пара- и аутокринной.
2. Гормоны – первичные посредники. Общие биологические признаки гормонов. Классификации гормонов в соответствии с химическим строением, биологическими функциями, принадлежностью к эндокринным железам.
3. Либерины и статины гипоталамуса, строение и роль. Гормоны – производные проопиомеланокортина, синтез и значение альтернативного процессинга, функции. Гормоны задней доли гипофиза, происхождение и роль. Значение тропных гормонов гипофиза.
4. Характеристика гормонов гипофиза (соматотропин, вазопрессин, окситоцин, липотропин, меланоцитостимулирующий гормон) по общему плану: *название, химическая природа/формула, место синтеза, регуляция синтеза и секреции, основные органы-мишени, локализация рецепторов в клетке, механизм действия, влияние на обмен веществ и функции организма; причины и основные клинические проявления гипо- и гиперфункции.*

5. Адреналин: характеристика по общему плану (см. п.4), химизм синтеза и инактивации, клинические проявления и основы лечения феохромоцитомы. Типы адренорецепторов и особенности их действия. Биохимические эффекты адреналина при стрессовых ситуациях. Механизм лечебного действия адреналина при остановке сердца, приступах астмы.
6. Этапы синтеза стероидных гормонов из холестерина. Прегненолон, прогестерон – ключевые соединения пути синтеза. Специфические гидроксилазы синтеза глюко-, минералокортикоидов. Роль ароматаз в синтезе эстрогенов.
7. Роль гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы. Характеристика кортиколиберина, кортикотропина (АКТГ) и кортизола по общему плану (см. п.4). Изменение метаболизма в жировой, мышечной, лимфоидной, эпителиальных тканях при гипо- и гиперкортицизме. Стероидный диабет.
8. Ренин-ангиотензин-альдостероновая система. Волюморцепторы и система ренин-ангиотензин в регуляции синтеза и секреции альдостерона, значение ферментов. Биохимический механизм развития почечной гипертензии. Характеристика альдостерона по общему плану (см. п.4), влияние на обмен минеральных веществ и воды.
9. Система половых гормонов. Характеристика окситоцина, лактотропного, фолликулостимулирующего и лютеинизирующего гормонов гипофиза, прогестерона и эстрадиола, тестостерона по общему плану (см. п.4). Цикличность изменений концентрации гонадотропных гормонов, прогестерона и эстрогенов в организме женщины (менструальные циклы). Анаболические эффекты тестостерона и эстрогенов.
10. Система паратгормон-кальцитонин-кальцитриолы. Альтернативность и синергизм действия в системе. Характеристика по общему плану (см. п.4), значение в регуляции кальций-фосфорно-магниевого обмена, влияние на состояние костно-мышечной системы и тканей зуба. Химизм синтеза активных кальцитриолов и кальцифедиола из холестерина.

Темы для реферативных сообщений

1. Механизмы и уровни регуляции функций эндокринных желез, нарушения механизмов и последствия.
2. Гормонозависимая индукция и репрессия синтеза белка. Особенности рецептора и гормонорецепторного комплекса, их действие. Гормоночувствительный элемент ДНК.
3. Глюкокортикоиды – лекарственные препараты. Механизм противовоспалительного и антиаллергического действия, побочные эффекты.
4. Роль глюкокортикоидов при стресс-реакции организма и в развитии адаптационного синдрома. Работы Г.Селье, Ф.Меерсона и др.
5. Гормональные изменения в организме женщины при беременности. Влияние гормональных заболеваний матери на развитие плода.
6. Синтетические аналоги эстрогенов и прогестинов в гормональной контрацепции, её механизмы и побочные эффекты.
7. Синтетические аналоги тестостерона - лекарственные препараты. Анаболические стероиды и другие гормоны в медицине и спорте, побочные эффекты.

Самостоятельная работа

1. Заполнить графы 1–8 таблицы гормонов (приложение 3). Информацию представить по основным гормонам гипоталамуса, гипофиза, поджелудочной, щитовидной и паращитовидных желез, надпочечников и половых желез, гормонально активным формам витамина D₃.
2. Дополнить графы таблицы аминокислот в приложении 1. Информацию представить согласно участию аминокислот в реакциях синтеза гормонов.
3. Дополнить схему обмена липидов (см. темы 5.1 и 5.2), представив химизм синтеза стероидных гормонов и кальцитриолов из холестерина, вторичных посредников из фосфатидилинозитола, высвобождение арахидоновой кислоты из фосфатидилхолина для синтеза эйкозаноидов.

Лабораторная работа 1

Качественная реакция на йод в тироксине

Принцип

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

Реактивы

1) 10 % раствор NaOH, 2) 10 % раствор H₂SO₄, 3) 2 % раствор KI, 4) 10 % раствор NaHCO₃, 5) 1 % раствор крахмала, 6) 0,5 % спиртовой раствор фенолфталеина, 7) лакмусовая бумага.

Материал для исследования

Таблетки тиреоидина (лаборанты выполняют гидролиз тиреоидина: растирают в ступке 10 таблеток, вносят в колбу для гидролиза, добавляют 20 мл 10% NaHCO₃, колбу с обратным холодильником помещают на асбестовую сетку, кипятят точно 15 мин с момента закипания).

Проведение анализа

Для обнаружения йода в гидролизате тиреоидина наливают 24 капли гидролизата, 3 капли 1 % раствора крахмала, 1 каплю 0,5 % спиртового раствора фенолфталеина, 4 капли 2 % раствора KI, добавляют 10-15 капель 10 % раствора H₂SO₄ до прекращения выделения пузырьков углекислого газа и появления синего окрашивания.

Оформление работы

Указывают принцип метода, регистрируют результаты анализа, делают вывод о наличии тироксина в исследуемом материале, указывают значение гормона в организме.

Лабораторная работа 2

Качественные реакции на адреналин

Реактивы

1) 10 % раствор NaOH, 2) 0,15 М раствор FeCl₃.

Материал для исследования

Раствор адреналина, приготовленный *ex tempore*.

РЕАКЦИЯ НА ПИРОКАТЕХИНОВОЕ КОЛЬЦО АДРЕНАЛИНА

Принцип

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

Проведение анализа

К 10 кап. раствора адреналина добавляют 1 кап. раствора FeCl₃. Наблюдают зеленое окрашивание. После добавления 1 кап. 10 % раствора NaOH окраска становится вишнево-красной.

ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ ПРОДУКТОВ ОКИСЛЕНИЯ АДРЕНАЛИНА

Принцип

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

Проведение анализа

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

Оформление работы

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

Лабораторная работа 3

Качественные реакции на белковый характер инсулина

Принцип

Инсулин - простой белок, дает характерные качественные реакции: биуретовую, ксантопротеиновую, Фоля и другие неспецифичные реакции.

Материал для исследования

Раствор инсулина.

Реактивы

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

Проведение анализа

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

РЕАКЦИЯ НА ПЕПТИДНУЮ СВЯЗЬ

Пептидные связи выявляют универсальной биуретовой реакцией.

Проведение анализа

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

РЕАКЦИЯ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ α-АМИНОГРУПП

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

Проведение анализа

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

РЕАКЦИЯ НА АРОМАТИЧЕСКИЕ АМИНОКИСЛОТЫ

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

Проведение анализа

К 5 каплям 1 % раствора инсулина вносят 2 капли конц. HNO₃, осторожно нагревают и наблюдают за появлением желтого окрашивания. При отсутствии желтого цвета добавляют еще 1-2 капли конц. HNO₃. Далее добавляют избыток 30 % раствора NaOH, наблюдают изменение желтой окраски на оранжевую.

РЕАКЦИИ НА СЕРОСОДЕРЖАЩИЕ АМИНОКИСЛОТЫ

Принцип

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

Проведение анализа

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

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

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

Оформление работы

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

Вопросы для самоконтроля

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

ТЕМА 8.2

СТРОЕНИЕ И РОЛЬ БИОМЕМБРАН. МЕХАНИЗМЫ ТРАНСПОРТА И РЕЦЕПЦИИ (СЕМИНАР)

Актуальность

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

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

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

Цель

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

Вопросы для самоподготовки

1. Разнообразие компонентов биомембран, межмолекулярные связи и взаимодействия в составе мембран.
2. Строение, свойства и функции мембранных липидов. Значение полиненасыщенных жирных кислот и холестерина. Аннулярные липиды. Липидные якоря: происхождение и назначение.
3. Белки мембран, классификации по локализации и функциям.
4. Состав, локализация и назначение углеводного компонента мембран.
5. Липопротеины, гликопротеины и гликолипиды мембран.
6. Свойства и основные функции биомембран клетки. Асимметрия липидов клеточной мембраны, функциональное значение. Флиппазы.
7. Особенности плазматической мембраны клетки и мембран органелл: ядерной, митохондриальной, лизосомальной, микросомальной и шероховатой эндоплазматической сети. Маркёрные ферменты биомембран.
8. Биохимическое обеспечение механизмов трансмембранного переноса веществ: простой и облегченной диффузии, активного транспорта, эндо- и экзоцитоза. Каналы и поры.
9. Липосомы как модельная система биомембран, их применение в фармации и медицине.
10. Характеристика основных типов рецепторов плазмалеммы, обеспечивающих передачу гормонального сигнала в клетки-мишени.
11. Характеристика мембранных механизмов передачи гормонального сигнала в клетки-мишени через рецепторы:
 - I типа, обладающие ферментной активностью (рецептор инсулина),
 - II типа, образующие ионный канал (рецептор ацетилхолина),
 - III типа, использующие G-белок (компоненты передающей системы, роль активирующей/ингибирующей α -субъединицы G-белка):
 - a. аденилатциклазный механизм (и гормоны, использующие его),
 - b. Са-фосфолипидный механизм (и гормоны, использующие его).
12. Гуанилатциклазный механизм передачи сигнала: мембраносвязанный и растворимый рецепторы. Общая характеристика и виды гуанилатциклаза. Гормоны, использующие этот механизм.
13. Связь гуанилатциклазного механизма с синтезом NO, типы NO-синтаз, реакционная способность и биологическое значение NO, способы утилизации.
14. Строение, источники, реакции синтеза вторичных посредников передачи гормонального сигнала: цАМФ, цГМФ, ИФ₃, ДАГ, ионы Ca²⁺, NO.
15. Характеристика цитозольно-ядерного механизма передачи гормональных сигналов в клетки-мишени. Гормоны, использующие этот механизм.
16. Биологический смысл существования иерархии регуляторных систем, использующих различные механизмы передачи одного гормонального сигнала к компартментам клетки-мишени.

Темы для реферативных сообщений

1. Гликолипиды мембран: структура, функции, нарушения обмена.
2. Синтез, строение, назначение липидных "якорей", функционирование в биомембранах.
3. Влияние токсинов возбудителей холеры и дифтерии на аденилатциклазный механизм пораженной клетки.
4. Роль монооксида азота (NO) в регуляции деятельности клеток в норме и патологии, участие в действии лекарств.
5. Строение и характеристика липосом. Использование липосом для транспорта лекарственных средств.

Вопросы для самоконтроля

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

Тестовые задания

Выбрать один правильный ответ.

1. СОДЕРЖАНИЕ КАЛЬЦИЯ И ФОСФАТОВ В КРОВИ РЕГУЛИРУЮТ

- 1) адреналин и глюкагон
- 2) адреналин и тироксин
- 3) паратгормон и кальцитонин
- 4) кальцитонин и соматотропин
- 5) кальцитриол и кортизол

2. СИНТЕЗ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ В КОРЕ НАДПОЧЕЧНИКОВ СТИМУЛИРУЕТ

- 1) кортикотропин
- 2) кортиколиберин
- 3) кортизол
- 4) кальцитонин
- 5) кальцитриол

3. ФУНКЦИЕЙ ИНСУЛИНА ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) стимуляция липолиза
- 2) активация гликогенолиза
- 3) увеличение гликемии
- 4) усиление липогенез
- 5) активация глюконеогенеза

4. ПРИ ПОВЫШЕНИИ УРОВНЯ СОМАТОТРОПИНА РАЗВИВАЕТСЯ

- 1) акромегалия
- 2) синдром Иценко-Кушинга
- 3) Базедова болезнь
- 4) сахарный диабет
- 5) остеопороз

5. ДЛЯ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА СПЕЦИФИЧЕН БЕЛОК

- 1) гемоглобин
- 2) H^+ /АТФ-синтаза
- 3) гликофорин
- 4) Na^+/Ca^{2+} -обменник
- 5) Na^+/K^+ -АТФаза

6. В СОСТАВЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН ПРИСУТСТВУЮТ

- 1) эфиры холестерина и сфинголипиды
- 2) свободный холестерол и гликолипиды
- 3) фосфолипиды и триацилглицеролы
- 4) гликолипиды и триолеинглицеролы
- 5) фосфолипиды и эфиры холестерина

7. ПРИ ПОДДЕРЖАНИИ ТЕКУЧЕСТИ МЕМБРАН МИНИМАЛЬНЫМ ТИПОМ ДВИЖЕНИЙ МОЛЕКУЛ В БИСЛОЕ ЛИПИДОВ ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) латеральная диффузия
- 2) движение по типу "пинг-понг"
- 3) трансмембранный перескок "флип-флоп"
- 4) вращение
- 5) изгибание
- 6) хемотаксис

8. РЕЦЕПТОР СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ В ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЕ СПОСОБЕН

- 1) обеспечивать проницаемость мембраны клетки
- 2) специфически узнавать и реагировать с липидным окружением
- 3) генерировать внутриклеточный управляющий сигнал
- 4) взаимодействовать с АТФ
- 5) поддерживать структуру мембраны

9. ВТОРИЧНЫМИ МЕССЕНДЖЕРАМИ ФОСФОЛИПИДНОГО МЕХАНИЗМА ПЕРЕДАЧИ РЕГУЛЯТОРНОГО СИГНАЛА В КЛЕТКУ ЯВЛЯЮТСЯ

- 1) цАМФ, цГМФ, Ca^{2+}
- 2) ДАГ, ИФ₃, NO
- 3) ДАГ, ИФ₃, Ca^{2+}
- 4) цГМФ, Ca^{2+} , NO
- 5) цАМФ, Ca^{2+} , NO

10. ВОЗДЕЙСТВИЕ АНГИОТЕНЗИНА НА МЕМБРАННЫЙ РЕЦЕПТОР ПРИВОДИТ К

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

Ситуационные задачи

1. При обследовании мальчика 5 лет врач отметил отставание умственного и психического развития, замедление роста, понижение температуры тела. Ребенок мало активен, не эмоционален. В крови снижено содержание холестерина. *Указать, о дисфункции какой эндокринной железы можно думать. Пояснить, в чем причина таких симптомов.*
2. Больная обратилась в клинику с жалобами на сухость во рту, сильную жажду, обильное и частое мочеиспускание, слабость, нарушение сна, похудание. *Указать, для какого заболевания характерны эти симптомы. Пояснить, какие гормоны могут быть ответственны за нарушения, какие лабораторные исследования нужны для уточнения диагноза и оценки состояния обмена веществ.*
3. Больной жалуется на сильную слабость, повышенную утомляемость. Часто бывают явления гипогликемии. Усилена пигментация кожи. Имеются анемия, лимфоцитоз, эозинофилия. Уменьшена реабсорбция натрия из мочи. *Пояснить, в чем причина таких симптомов. Указать, о недостаточности каких гормонов можно думать, пояснить почему.*

РАЗДЕЛ 9

НЕРВНАЯ И МЫШЕЧНАЯ ТКАНИ. МЕДИАТОРЫ

ТЕМА 9.1

НЕРВНАЯ И МЫШЕЧНАЯ ТКАНИ. МЕДИАТОРЫ

Актуальность

Специфические особенности, определяемые характером функций, выполняемых нервной системой в целостном организме, проявляются в химическом составе и метаболизме нервной ткани. Ведущую роль в поддержании функциональной активности нейронов играет медиаторный обмен. Мышечная ткань находится под контролем нервной системы и участвует в поддержании структурно-функциональных характеристик организма, в том числе челюстно-лицевого аппарата. Мышечная ткань в количественном отношении преобладает среди других тканей, её основной функцией является реализация двигательного акта, когда в ходе сокращения специальные белки осуществляют работу, связанную с преобразованием химической энергии в механическую. Источником энергии для деятельности мозга и мышц выступают химические соединения с макроэргическими связями – АТФ и креатинфосфат. Так, распад АТФ до АДФ и фосфата напрямую связан с механизмом работы поперечнополосатого мышечного волокна. Ресинтез АТФ обеспечивается, в первую очередь, реакцией трансфосфорилирования АДФ креатинфосфатом, дополнительно – аденилаткиназной (миокиназной) реакцией. Креатинкиназной путь ресинтеза АТФ очень быстр и максимально эффективен – за счет 1 молекулы креатинфосфата образуется 1 молекула АТФ. Запасы креатинфосфата в мышце невелики, а доступность энергии креатинфосфата имеет ценность для работающей мышцы, если только ее расход постоянно возмещается синтезом АТФ в процессе метаболизма. Энергетика мозга основана на окислительном фосфорилировании, в мышцах вклад в регенерацию богатых энергией фосфатных соединений может вносить и анаэробный гликолиз.

Цель

1. Сформировать представление о многообразии форм нервной и мышечных тканей, их молекулярном составе, роли в поддержании структурно-функциональных характеристик челюстно-лицевой области в норме и при патологии.
2. Оценить основные метаболиты энергетического обмена мышечной ткани путем определения содержания макроэргических соединений – АТФ и креатинфосфата.
3. Оценить активность фермента холинэстеразы, катализирующего в нервной ткани распад медиатора ацетилхолина.

Вопросы для самоподготовки

1. Виды медиаторов нервной ткани, способы и химизм их образования и инактивации, механизмы действия на постсинаптические мембраны (на примере норадреналина, ГАМК, ацетилхолина, дофамина), роль Ca^{2+} , ферментов, биологические эффекты.
2. Особенности обмена углеводов в нервной ткани. Значение глюкозы для нервной ткани, роль аэробного окисления глюкозы в энергетическом обмене, ГАМК-шунт. Влияние гипогликемии и гипоксии на метаболизм мозга.
3. Особенности обмена липидов в нервной ткани. Строение миелиновых оболочек, синтез фосфолипидов миелина, белковый компонент. Специфические белки. Прионы и болезни. Болезнь Альцгеймера, причины и последствия.
4. Малые регуляторные пептиды мозга (нейропептиды): влияние на деятельность нервной системы и роль в организме, синтез и способы инактивации (на примере преобразований проопиомеланокортина). Участие энкефалинов, эндорфинов, динорфинов в механизмах обезболивания, рецепторы.

5. Нервная ткань зуба, зубные сплетения, основные причины лицевой боли. Биохимия ноцицепции и антиноцицепции, медиаторы болевой чувствительности, роль малых регуляторных пептидов.
6. Сократительные (миозин, актин), регуляторные (тропомиозин, тропонин), вспомогательные (миоглобин, α -актинин и др.) белки миофибрилл.
7. Ведущая функция мышечной ткани, механизм мышечного сокращения и расслабления. Роль кальциевых каналов саркоплазматической сети, Ca^{2+} -зависимая АТФаза (кальциевый насос).
8. Источники АТФ при разной интенсивности и длительности работы мышц. Анаэробная энергетика мышц, механизмы и скорость утилизации лактата. Роль креатинфосфата. Максимально возможная скорость потребления O_2 при выполнении мышечной работы. Кислородная задолженность организма.
9. Образование и экскреция 3-метилгистидина. Креатинин и его клиренс. Креатинурия. Патологии мышечной ткани.
10. Особенности сердечной и гладкомышечной ткани. Белки, связывающие жирные кислоты. Биохимическая диагностика повреждений миокарда: маркерные белки и ферменты.

Самостоятельная работа

1. Дополнить схему углеводно-энергетического обмена (см. темы 3.1, 4.1, 4.2), представив реакции ГАМК-шунта, связанные с циклом Кребса.
2. Дополнить графы таблицы аминокислот в приложении 1, представив информацию об участии аминокислот в реакциях синтеза медиаторов.

Лабораторная работа 1

Определение содержания АТФ и креатинфосфата в мышечной и нервной ткани

Мышечная, нервная ткани содержат макроэргические соединения – АТФ, креатинфосфат, которые по необходимости обеспечивают мозг и мышцы энергией.

Принцип

Метод основан на отщеплении при непродолжительном гидролизе в кислой среде так называемого лабильно связанного фосфора богатых энергией связей (два последних остатка фосфорной кислоты АТФ и фосфатный остаток креатинфосфата). Сравнение содержания неорганического фосфата в пробах до и после гидролиза дает представление о количестве лабильно связанного фосфора макроэргических соединений в изучаемой ткани. Количество неорганического фосфата определяют по цветной реакции с молибдатом аммония в присутствии аскорбата.

Реактивы

1) 2,5 % раствор ТХУ, 2) 1 М раствор NaOH, 3) 1 М раствор HCl, 4) 1 % раствор молибдата аммония, 5) 1 % раствор аскорбиновой кислоты.

Калибровочный график на фосфор (лаборанты готовят заранее).

Материал для анализа

Мышечная ткань и нервная ткань (головной мозг) крысы.

Проведение анализа

Взвешивают 0,5 г мышц (обозначают как опыт-М) и 0,5 г нервной ткани (обозначают как опыт-Н), гомогенизируют каждую из навесок в 5 мл охлажденной 2,5 % ТХУ в ступке, помещенной в ледяную баню. Оба гомогената фильтруют в мерные пробирки через воронку, промывают осадки на фильтрах 5 мл холодной дистиллированной воды. Объем пробы в каждой пробирке доводят дистиллированной водой до 10 мл.

Оценку содержания неорганического фосфата в каждой из опытных проб (и в соответствующих им контрольных пробах) проводят по таблице:

Реагенты, мл	Опыт (М или Н)	Контроль (М или Н)
Безбелковый фильтрат	0,5	0,5
1 М раствор HCl	1,0	1,0
	Кипятят 10 мин для гидролиза фосфатных связей, охлаждают	Не кипятить!!!
1 М раствор NaOH	1,0	1,0
H ₂ O дистиллированная	7,5	7,5
	Переносят по 5 мл жидкости в чистые пробирки	
Молибдат аммония	0,5	0,5
Аскорбиновая кислота	0,5	0,5
H ₂ O дистиллированная	2,0	2,0
	Перемешивают, инкубируют 10 мин при комнатной температуре и измеряют при длине волны 670 нм против воды в кювете 1 см	

Расчёты:

Неорганический фосфат в пробах опыт-М и опыт-Н после гидролиза представляет собой сумму лабильно связанного фосфата и тканевых фосфатных солей, в контроле – только фосфатные соли. Вклад лабильно связанного фосфата макроэргов вычисляют по разности экстинкций опытной пробы (М или Н) и соответствующего контроля (М или Н)

$$E_{\text{ЛФМ}} = E_{\text{ОП}} - E_{\text{К}}$$

где: $E_{\text{ЛФМ}}$ – экстинкция лабильно связанного фосфата суммы макроэргов,

$E_{\text{ОП}}$ – экстинкция опытной пробы, $E_{\text{К}}$ – экстинкция контрольной пробы.

Разность ($E_{\text{ЛФМ}}$) используют для поиска концентрации лабильно связанного неорганического фосфата макроэргов по прилагаемому к работе калибровочному графику. Количество лабильно связанного фосфата рассчитывают по формуле:

$$X = A \times 3,3 \times 400 \times 1000$$

где: X – содержание макроэргических соединений (в пересчете на 1 мг АТФ в 1 кг сырой ткани); A – содержание АТФ в пробе (мг); $3,3 \times 400$ – коэффициенты пересчета на 1 г ткани с учётом разведения растворов; 1000 – коэффициент пересчёта на 1 кг ткани.

Оформление работы

Приводят принцип метода, регистрируют показания прибора, делают расчеты и выводы по содержанию макроэргов в нервной и мышечной тканях, указывают значение макроэргов.

Лабораторная работа 2

Определение активности холинэстеразы в сыворотке крови

Ферменты синтеза медиаторов ацетилхолина и норадреналина находятся в постсинаптических окончаниях соответствующих нервных волокон. Холинэстераза, превращающая ацетилхолин в ацетат и холин, из которых идёт его синтез – на поверхности постсинаптической мембраны. В отличие от ацетилхолина норадреналин не превращается в исходный тирозин, продукты инактивации повторно не используются. Ацетилхолин реагирует с рецепторами и холинэстеразой; прозерин конкурирует за связывание ацетилхолина лишь с холинэстеразой. Прозерин – конкурентный ингибитор, вызывает накопление в синапсе ацетилхолина, беспрепятственно действующего на рецепторы. Действие прозерина на холинэстеразу снижается при повышении уровня ацетилхолина, эффект прозерина (усиление парасимпатических реакций) при введении ацетилхолина не снижается. Дополнительное введение ацетилхолина может высвободить холинэстеразу, но не снизит уровень ацетилхолина и возбуждение.

Принцип

Холинэстераза катализирует реакцию гидролиза ацетилхолина с образованием холина и уксусной кислоты. В итоге меняется pH буферного раствора, поэтому мерой активности фермента может быть изменение pH инкубационной среды.

Реактивы

1) 3,5 % раствор ацетилхолина, 2) раствор мединала для калибровочной кривой (10,3 г мединала в 500 мл воды), 3) 0,1 М раствор HCl, 4) веронал-мединаловый буфер, pH 8,4 (2,06 г мединала в 100 мл воды; 82,3 мл раствора смешать с 17,7 мл 0,1 М раствора HCl), 5) 0,02 % феноловый красный на 0,025 М растворе HCl, 6) раствор прозерина.

Лаборанты заранее готовят калибровочный график, используя для его построения ряд буферных растворов с разными значениями pH:

Компоненты, мл	Значение pH									
	7,0	7,2	7,4	7,6	7,8	8,0	8,2	8,4	8,6	
Раствор мединала	5,36	5,54	5,81	6,15	6,62	7,16	7,69	8,23	8,71	
0,1 М раствор HCl	4,64	4,46	4,19	3,85	3,38	2,84	2,31	1,77	1,29	

К 10 мл каждого из буферов добавляют по 0,1 мл фенолового красного и определяют экстинкцию (аналогично опытными пробам). При построении графика по оси ординат откладывают величины экстинкции, по оси абсцисс – значения pH.

Материал для анализа

Сыворотка или плазма крови.

Проведение анализа

Готовят 2 опытные пробы и 1 контрольную пробу согласно таблице:

Реагенты, мл	Опыт 1	Опыт 2	Контроль
Буферный раствор	1,0	1,0	1,0
Плазма/сыворотка крови	0,1	0,1	0,1
Раствор ацетилхолина	0,5	0,5	-
H ₂ O дистиллированная	-	-	0,5
Раствор прозерина	-	0,1	-
Перемешивают, инкубируют 57 мин при 37°C			
H ₂ O дистиллированная	3,5	3,4	3,5
Р-р фенолового красного	0,1	0,1	0,1
Перемешивают, инкубируют 3 мин в термостате (водяной бане) при 37°C. Измеряют оптическую плотность всех проб против воды в кювете 1 см при длине волны 536 нм (зелёный светофильтр)			

Расчёты

Активность ацетилхолинэстеразы оценивают:

- 1) согласно калибровочному графику по величине изменения pH (опытной пробы 1 относительно контроля, а также между опытными пробам 1 и 2),
- 2) в миллимолях уксусной кислоты на 1 л сыворотки за 1 ч инкубации.

Оформление работы

Указывают принцип метода, регистрируют результаты, делают расчёты, вывод.

Вопросы для самоконтроля

1. Разнообразие нервной и мышечной ткани. Локализация и функции.
2. Разнообразие рецепторного аппарата клетки. Строение и функционирование синапса, роль кальция, постсинаптической мембраны и ферментов.
3. Виды медиаторов, синтез и инактивация, роль. Аминокислоты–медиаторы, обмен аминокислот (тирозина, глутамата, триптофана и др.), участвующих в образовании медиаторов.
4. Нервно-мышечная передача. Регуляция.
5. Нейропептиды, синтез и рецепция, роль в нервной ткани и организме, участие в болевых реакциях. Нервная ткань зуба, ноцицепторы челюстно-лицевой области, биохимия боли. Химизм боли после мышечной нагрузки.

6. Обмен углеводов и энергетика в нервной и мышечной ткани, роль глюкозы и O_2 , энергетические субстраты, значение гликолиза и глюконеогенеза, ЦТК и окислительного фосфорилирования, гипогликемии и гипоксии. АТФазы.
7. Липиды нервной ткани. Строение и функции миелина, роль липидного и белкового компонента, миелиновые болезни.
8. Сократительные, вспомогательные и регуляторные белки мышц, их роль. Механизм сокращения–расслабления, источники АТФ и потребление O_2 . Креатинфосфат. Патологии мышечной ткани, диагностика.
9. Особенности сердечной и гладкомышечной ткани. Жирные кислоты и миокард. Диагностика повреждений миокарда.

Тестовые задания

Выбрать один правильный ответ.

1. ТЕМНЫЕ ПОЛОСКИ (А-ДИСКИ) МИОФИБРИЛЛ ОБРАЗОВАНЫ

- 1) актином
- 2) миозином
- 3) тропонином
- 4) миоглобином
- 5) кальмодулином

2. МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ КАТАЛИЗИРУЮТ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННУЮ МОДИФИКАЦИЮ МИОЗИНА И АКТИНА ПО ОСТАТКАМ

- 1) гистидина и лизина
- 2) пролина и лизина
- 3) пролина и гидроксипролина
- 4) пролина и гистидина

3. ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ИНФАРКТА МИОКАРДА В КРОВИ ОПРЕДЕЛЯЮТ УРОВЕНЬ

- 1) тропонина Т и I
- 2) тропонина Т и С
- 3) тропонина С и ионов Ca^{2+}
- 4) тропонина Т и ионов Ca^{2+}
- 5) тропонина С и I

4. ОТКРЫТИЕ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА ВЫЗЫВАЕТ ВЫБРОС МЕДИАТОРА

- 1) дофамина
- 2) адреналина
- 3) ацетилхолина
- 4) норадреналина
- 5) фосфатидилхолина

5. ОСНОВНЫМ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИМ СУБСТРАТОМ ДЛЯ МИОКАРДА ЯВЛЯЮТСЯ

- 1) кетоновые тела
- 2) жирные кислоты
- 3) глюкоза
- 4) аминокислоты
- 5) циклонуклеотиды

6. НЕРВНО-ПАРАЛИТИЧЕСКИЕ ЯДЫ (ТАБУН, ЗАРИН) НАРУШАЮТ НЕРВНО-МЫШЕЧНУЮ ПЕРЕДАЧУ И ВЫЗЫВАЮТ СМЕРТЬ ОТ ОСТАНОВКИ ДЫХАНИЯ, ИНГИБИРУЯ

- 1) альдолазу
- 2) гексокиназу
- 3) моноаминооксидазу
- 4) ацетилхолинэстеразу
- 5) креатинкиназу

7. ПОСТУПЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ В НЕЙРОН ОБЕСПЕЧИВАЕТ ПЕРЕНОСЧИК

- 1) GLUT-1
- 2) GLUT-2
- 3) GLUT-3
- 4) GLUT-4
- 5) GLUT-5

8. В МЕХАНИЗМАХ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА ПРИ ВОЗНИКНОВЕНИИ И ПРОВЕДЕНИИ НЕРВНОГО ИМПУЛЬСА УЧАСТВУЮТ ИОНЫ

- 1) K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , Γ^-
- 2) Na^+ , Cl^- , K^+ , Ca^{2+}
- 3) Na^+ , Cl^- , Mg^{2+} , K^+
- 4) Cl^- , K^+ , Na^+ , Mn^{2+}
- 5) K^+ , Fe^{2+} , Na^+ , Cl^-

9. ВОЗБУЖДАЮЩИМ МЕДИАТОРОМ В НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ СЛУЖИТ

- 1) ГАМК
- 2) глицин
- 3) глутамат
- 4) серотонин
- 5) аденозин

10. НОРАДРЕНАЛИН В АДРЕНЕРГИЧЕСКИХ СИНАПСАХ НЕ МОЖЕТ

- 1) влиять на α - или β -адренорецепторы
- 2) реабсорбироваться и повторно использоваться
- 3) реабсорбироваться и инактивироваться моноаминооксидазами
- 4) взаимодействовать с рецепторами пресинаптической мембраны
- 5) реабсорбироваться и инактивироваться эстеразами

Ситуационные задачи

1. У больных алкоголизмом часты расстройства функции ЦНС – потеря памяти, психозы. Указать, какие изменения биохимических показателей крови и мочи присущи этой патологии. Пояснить, избыток какого токсичного для мозга метаболита характерен при алкоголизме, какой кофермент является основным в утилизации этого метаболита, в катализе каких реакций участвует и какие продукты можно рекомендовать для снижения дефицита кофермента.
2. Боли в области сердца могут возникать как при приступах ишемической болезни сердца, так и при язве желудка или 12-перстной кишки. Предложить биохимические способы дифференциальной диагностики этих заболеваний по показателям плазмы крови.
3. Появление эпилептиформных припадков может сопровождаться гиповитаминозом по витаминам группы В. Указать, недостаточность какого витамина ответственна за возникновение припадков. Пояснить, почему нарушается баланс возбуждения и торможения в нервной ткани.

ТЕМА
**СИСТЕМЫ РЕГУЛЯЦИИ И БИОМЕМБРАНЫ.
ГОРМОНЫ И МЕДИАТОРЫ
(КОНТРОЛЬНОЕ ЗАНЯТИЕ ПО РАЗДЕЛАМ 8 И 9)**

Вопросы для самоподготовки

Мембраны и рецепция

1. Разнообразие компонентов биомембран, строение клеточных мембран, межмолекулярные связи и взаимодействия в составе мембран. Липопротеины, гликопротеины и гликолипиды. Состав, локализация и назначение углеводного компонента мембран, участие в рецепции и контактах клетки.
2. Строение, свойства и функции мембранных липидов. Значение полиненасыщенных жирных кислот и холестерина, мембраны как источник регуляторных веществ. Аннулярные липиды. Липидные якоря: происхождение, синтез и назначение.
3. Белки мембран, классификации по локализации и функциям. Поверхностные и трансмембранные белки и ферменты, каталитический домен. Участие в сигналинге.
4. Свойства и основные функции биомембран клетки. Разнообразие и специфика мембран. Асимметрия липидов клеточной мембраны и её функциональное значение, флиппазы. Маркёрные ферменты.
5. Особенности мембран клетки: плазматическая и ядерная мембраны, мембраны митохондрий, эндоплазматической сети, лизосом, пероксисом. Каналы и поры плазмолеммы и мембран клеточных органелл.
6. Биохимическое обеспечение активных и пассивных механизмов трансмембранного переноса малых веществ и макромолекул (простой и облегченной диффузии, активного транспорта, эндо- и экзоцитоза).
7. Липосомы как модельная система биомембран, их строение, применение в фармации и медицине.
8. Мембранные механизмы передачи гормонального сигнала в клетку-мишень. Виды рецепторов плазмолеммы: с ферментативной активностью, с ионопроводящей активностью и связанные с G-белками. Регуляция работы рецепторного аппарата (фосфорилирование, понижающая регуляция).
9. Взаимодействие вторичных посредников при передаче сигнала в клетку.
10. Системы вторичных посредников и рецепторы, связанные с G-белками, взаимодействие этих систем. Аденилатциклазный и кальций-фосфолипидный механизмы действия гормонов: трансдукция сигнала рецептором, протеинкиназы и фосфорилирование белков, ответственных за проявление эффекта. Строение вторичных посредников, источники и реакции синтеза.
11. Ионы кальция как вторичные посредники, регуляция уровня кальция в цитозоле клетки, кальмодулин, кальциевые каналы, биологическая роль кальция.
12. Общая характеристика гуанилатциклазного механизма действия гормонов, мембрано-ассоциированный и растворимый рецепторы, взаимосвязь с синтезом NO. Строение вторичных посредников, источники и реакции синтеза.
13. Цитозольно-ядерный механизм действия гормонов. Отличие от мембранного механизма передачи гормонального сигнала в клетку. Цитозольные и ядерные рецепторы, понятие «гормон-чувствительный элемент». Механизм действия стероидных гормонов, активных форм витамина D₃.

Нервная и мышечная ткани. Медиаторы

1. Разнообразие нервной и мышечной ткани. Локализация и функции, взаимодействие. Организация нервно-мышечной передачи, регуляция.

2. Значение синапса в разнообразии рецепторного аппарата клетки. Строение и функционирование синапса, роль Ca^{2+} , постсинаптической мембраны, ферментов.
3. Виды медиаторов нервной ткани, их роль. Аминокислоты – медиаторы, аминокислоты (тирозин, глутамат, триптофан и др.) в реакциях образования и инактивации медиаторов. Значение ГАМК-шунта ЦТК.
4. Механизмы действия медиаторов нервной ткани (норадреналин, ГАМК, ацетилхолин, дофамин), рецепторы постсинаптических мембран, роль Ca^{2+} , ферментов, биологические эффекты. Медиаторы возбуждения и торможения. Модуляторы. Малые регуляторные пептиды мозга.
5. Нейропептиды, синтез и рецепция, роль в нервной ткани и организме, участие в болевых реакциях. Нервная ткань зуба, ноцицепторы челюстно-лицевой области, механизмы и биохимия зубной боли. Химизм боли после мышечной нагрузки.
6. Обмен углеводов и энергетика в нервной и мышечной ткани, роль глюкозы и O_2 , энергетические субстраты, значение гликолиза и глюконеогенеза, ЦТК и окислительного фосфорилирования, гипогликемии и гипоксии. АТФазы.
7. Липиды нервной ткани. Строение и функции миелина, роль липидного и белкового компонента, миелиновые болезни. Фосфор нервной ткани. Специфические белки. Прионы и болезни. Болезнь Альцгеймера, причины и последствия.
8. Сократительные, вспомогательные и регуляторные белки мышц, их роль. Механизм сокращения–расслабления, источники АТФ и потребление O_2 . Креатинфосфат. Патологии мышечной ткани, клиническая диагностика.
9. Особенности сердечной и гладкомышечной ткани. Жирные кислоты и миокард. Диагностика повреждений миокарда.

Гормональная регуляция

1. Иерархия регуляторных систем организма (роль ЦНС, гипоталамуса, гипофиза). Место гормонов в регуляции метаболизма и функций органов. Механизм обратной отрицательной связи. Общие биологические признаки гормонов, классификации (по химическому строению, биологическим функциям, принадлежности к эндокринным железам).
2. Классификация гормонов по химическому строению, по биологическим функциям, по принадлежности к эндокринным железам. Роль либеринов, статинов, тропных гормонов. Обратная отрицательная связь в регуляции синтеза и действия гормонов.
3. Соматотропный гормон: химическая природа, место синтеза, органы-мишени, локализация и механизм действия рецепторов, влияние на обмен веществ. Регуляция синтеза и секреции гормона, состояния, связанные с нарушением действия гормона.
4. Характеристика антидиуретического гормона (вазопрессин): химическая природа, место синтеза, органы-мишени, рецепция, влияние на обмен веществ и воды. Регуляция синтеза и секреции гормона. Состояния, обусловленные нарушением действия гормона.
5. Характеристика окситоцина: химическая природа, место синтеза, регуляция синтеза и секреции, органы-мишени, локализация рецепторов и механизм действия, эффекты.
6. Характеристика паратгормона и кальцитонина: химическая природа, место синтеза, регуляция синтеза и секреции, органы-мишени, локализация рецепторов и механизм действия, влияние на обмен кальция, фосфатов, витамина D_3 . Взаимодействие этих гормонов с гормонально активными формами витамина D_3 в обмене кальция и фосфатов.
7. Гормоны поджелудочной железы глюкагон и инсулин: химическая природа, место синтеза, регуляция синтеза и секреции, органы-мишени, локализация и механизм действия рецепторов, влияние на обмен углеводов, белков, липидов (ферменты, регулируемые гормоном). Состояния при отсутствии или избытке действия гормона.
8. Современные представления о механизмах развития инсулинзависимого сахарного диабета. Важнейшие изменения гормонального статуса и обмена веществ при сахарном диабете, механизмы развития осложнений сахарного диабета и диабетической комы.

9. Характеристика тиреотропного гормона: химическая природа, место синтеза, регуляция синтеза и секреции, органы-мишени, локализация рецепторов и механизм действия, эффекты.
10. Гормоны щитовидной железы тироксин и трийодтиронин: химическая природа, место синтеза, регуляция синтеза и секреции, органы-мишени, локализация рецепторов и механизм действия, влияние на обмен углеводов, белков, липидов. Состояния при отсутствии или избытке действия гормона.
11. Адреналин: химическая природа, место и химизм синтеза, органы-мишени, локализация рецепторов и механизм действия, влияние на обмен углеводов, белков, липидов (ферменты, регулируемые гормоном). Регуляция синтеза и секреции гормона. Состояния, обусловленные нарушением действия гормона. Участие адреналина в адаптивных реакциях организма при стрессе.
12. Характеристика адренокортикотропного гормона: химическая природа, место и принципы синтеза, регуляция синтеза и секреции, органы-мишени, локализация рецепторов и механизм действия, влияние на обмен веществ. Состояния, обусловленные отсутствием или избытком действия гормона.
13. Глюкокортикоиды: химическая природа, место и этапы синтеза, регуляция синтеза и секреции, органы-мишени, локализация рецепторов и механизм действия, влияние на обмен углеводов, белков, липидов. Состояния при отсутствии или избытке действия гормона. Участие глюкокортикоидов в адаптивных реакциях организма при стрессе, причины использования как противовоспалительных, противоаллергических лекарственных средств.
14. Минералокортикоиды: их химическая природа, место и этапы синтеза, регуляция синтеза и секреции, органы-мишени, локализация рецепторов и механизм действия, влияние на обмен электролитов и воды. Взаимосвязь с вазопрессином, ренин-ангиотензин-альдостероновая система.
15. Лактотропный гормон: химическая природа, место и этапы синтеза, регуляция синтеза и секреции, органы-мишени, локализация рецепторов и механизм действия, влияние на обмен веществ.
16. Характеристика гонадотропных гормонов: фолликулостимулирующий и лютеинизирующий гормоны: химическая природа, место и этапы синтеза, органы-мишени, локализация рецепторов и механизм действия, влияние на женский месячный цикл. Регуляция синтеза и секреции гормонов.
17. Андрогены и эстрогены: химическая природа, место и этапы синтеза, регуляция синтеза и секреции, органы-мишени, локализация рецепторов и механизм действия, влияние на обмен углеводов, белков, липидов, воздействие на костную ткань. Использование аналогов андрогенов и эстрогенов в качестве лекарственных средств.

Практическая часть

1. Определение активности холинэстеразы в сыворотке крови.
2. Определение содержания АТФ, креатинфосфата в мышцах и нервной ткани.
3. Качественные реакции на компоненты тироксина, адреналина, инсулина.

РАЗДЕЛ 10

СОЕДИНИТЕЛЬНАЯ, КОСТНАЯ И ЗУБНЫЕ ТКАНИ

ТЕМА 10.1

СОЕДИНИТЕЛЬНАЯ ТКАНЬ. ПУЛЬПА ЗУБА

Актуальность

Основной тип тканей, на которые простираются законы стоматологии, – это соединительные ткани. Они широко распространены в организме, отличаются преобладанием межклеточного вещества (матрикса) над клеточными элементами и выполняют целый ряд важнейших функций, с течением жизни претерпевают возрастные изменения. С соединительными тканями связано развитие процессов воспаления, метастазирования, деструкции с последующей репарацией и др. Знание химического состава соединительных тканей и понимание характерных метаболических процессов лежат в основе эффективной профилактики и лечения заболеваний стоматологического профиля.

Межклеточный матрикс соединительной ткани представлен комплексами белков и углеводов: гликопротеинов (коллагена, эластина, фибронектина и др.) и протеогликанов (больших, малых и мембраносвязанных). В отличие от гликопротеинов, содержащих менее 10 % углеводов, в протеогликанах более 95 % полисахаридов гликозаминогликановой природы. Благодаря высокой гидрофильности и свободе выбора конформации гликозаминогликаны занимают большие объёмы, образуя гели при довольно низких концентрациях самого полисахарида, что создаёт тургор тканей. Исследование гликопротеинов, протеогликанов, гликановых компонентов используют в диагностике заболеваний. При патологии матрикса соединительной ткани клиническое значение имеют пробы на гликозаминогликаны в моче. Деструкция матрикса сопровождается ростом количества сиаловых кислот и гексоз гликопротеинов в сыворотке крови. Сиаловые кислоты – концевые компоненты углеводной части гликопротеинов, участвуют в инактивации ряда патогенов. Распад коллагеновых волокон под действием металлопротеиназ приводит к образованию гликозидов гидроксипролина, свободного гидроксипролина, пиридинолина и росту их экскреции с мочой.

Цель

1. Сформировать представление о многообразии форм соединительной ткани и их молекулярном составе для понимания механизмов возникновения и развития заболеваний, разработки мер профилактики и методов лечения.
2. Оценить метаболизм компонентов матрикса соединительной ткани путем определения свободного гидроксипролина и компонентов гликозаминогликанов в моче, гексоз и сиаловых кислот гликопротеинов в сыворотке крови.

Вопросы для самоподготовки

1. Составные компоненты и типы соединительной ткани.
2. Коллаген. Аминокислотный состав, особенности пространственной структуры, стабилизирующие связи. Исколлагены. Основные типы коллагена, их роль в организме.
3. Внутри- и внеклеточные этапы синтеза и созревания коллагена, сшивки, ферменты. Значение структурной организации волокон коллагена для процессов минерализации.
4. Катаболизм коллагена. Маркёры синтеза и распада коллагена.
5. Эластин. Особенности первичной структуры и пространственного строения. Роль в организме. Образование и организация сшивок эластина. Сходство и различия коллагена и эластина.
6. Адгезивные и антиадгезивные белки внеклеточного матрикса и их функции. Семейства фибронектина, ламинина и др. Состав сахаров углеводного компонента гликопротеинов, строение и роль сиаловых кислот (нейраминовой и др.).

7. Гликозаминогликаны: семейства, строение основных представителей, принципы синтеза из глюкозы, локализация и роль в организме. Строение сахаров углеводного ко́ра протеогликанов.
8. Белковоуглеводные комплексы матрикса: принципы классификации, биологическая роль, механизмы синтеза и распада, роль долихола, кор и ко́ровые белки, образование О- и N-гликозидных связей протеогликанов, сборка надмолекулярных комплексов матрикса.
9. Болезни соединительной ткани (коллагенозы, мукополисахаридозы и др.).
10. Пульпа зуба как вариант соединительной ткани, особенности строения, органические и неорганические компоненты, основные характеристики.
11. Функции пульпы и её значение для метаболизма тканей зуба.

Самостоятельная работа

1. Нарисовать схему надмолекулярного агрегата протеогликанов.
2. Изобразить строение линейного и разветвлённого ко́ра протеогликанов.
3. Изобразить узлы О-гликозидной и N-гликозидной связи углеводного компонента с ко́ровыми белками в протеогликанах соединительной ткани.
4. Дополнить схему углеводно-энергетического обмена (см. темы 3.1, 4.1, 4.2, 9.1) реакциями глюкуронатного пути образования гликозаминогликанов из глюкозы в клетках соединительной ткани («путь уроновых кислот»), показать связь с гликогеногенезом и пентозофосфатным циклом. На схеме указать причину отсутствия синтеза аскорбата в организме человека.

Лабораторная работа 1

Определение содержания свободного гидроксипролина в моче

Актуальность

Строение полипептидных цепей коллагена уникально: каждую третью позицию на уровне первичной структуры занимает глицин. В регулярно повторяющемся трипептиде ГЛИ-Х-У положения Х и У чаще всего занимают пролин и 4-гидроксипролин, некоторые формы коллагена имеют ограниченное количество 3-гидроксипролина. Пирролидиновые кольца пролина обеспечивают стабилизацию α -спирали коллагена. Гидроксирование пролина осуществляют пролил-гидроксилазы в ходе посттрансляционной модификации коллагена, коферментами являются ионы железа (II) и аскорбиновая кислота.

Коллагеназы, разрушая трёхцепочечную структуру коллагена, высвобождают пролин и гидроксипролин. Свободный пролин в организме не гидроксится. Свободный гидроксипролин не способен вновь встраиваться в коллаген, что позволяет использовать концентрацию этого метаболита в крови и моче в качестве индикатора распада коллагеновых волокон. Недогидроксирование пролина является одной из главных причин потери зубов в случае развития цинги.

Материал для исследования

Свежая моча.

Принцип

При окислении и декарбоксилировании гидроксипролина образуется вещество, которое с п-диметиламинобензальдегидом даёт окрашенное соединение розового цвета. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации гидроксипролина в пробе.

Реактивы

1) 0,01 М раствор CuSO_4 , 2) 2,5 М раствор NaOH , 3) 6 % раствор пероксида водорода, 4) 6 М раствор H_2SO_4 , 5) реактив Эрлиха (5 % раствор п-диметиламинобензальдегида в п-пропанол или изопропанол).

Калибровочный график на гидроксипролин заранее готовят лаборанты. Студенты используют график для расчетов в ходе выполнения лабораторной работы.

Проведение анализа

	Опыт, мл	Контроль, мл
Моча	1,0	1,0
Раствор CuSO ₄	1,0	1,0
Раствор NaOH	1,0	1,0
Раствор H ₂ O ₂	1,0	1,0
	Для окисления и декарбоксилирования гидроксипролина пробы перемешивают 5 мин стеклянной палочкой, затем инкубируют 5 мин при 70°C в термостате или некипящей водяной бане, периодически встряхивая до полного прекращения выделения пузырьков. После окончания инкубации пробы охлаждают в ледяной бане.	
Раствор H ₂ SO ₄	4,0	4,0
Реактив Эрлиха	2,0	2,0
	Для развития цветной реакции пробы перемешивают стеклянной палочкой и инкубируют 80 сек	
	в кипящей водяной бане	в ледяной бане
	Измеряют оптическую плотность опытной и контрольной проб против воды при 500-560 нм (зеленый светофильтр) в кювете 1см	

Расчет

Из экстинкции опытной пробы (Еоп) вычитают экстинкцию контроля (Ек):

$$E = E_{оп} - E_{к}$$

Полученную величину (Е) используют для нахождения содержания гидроксипролина (мкг) в анализируемой пробе по прилагаемому калибровочному графику.

Для дальнейших расчетов используют формулу:

$$X = \frac{EV}{1000}$$

где: X – содержание гидроксипролина в моче (мг/сут); E – содержание гидроксипролина в пробе (мкг, найдено по калибровочному графику с учётом разницы экстинкций опыта и контроля); V – суточный объём мочи (мл); 1000 – коэффициент пересчёта мкг в мг.

Нормальные величины

Моча 1-8 мг/сут (экскреция свободного гидроксипролина).

Клинико-диагностическое значение

Концентрация гидроксипролина в биологических жидкостях является показателем метаболизма коллагена. Выделение гидроксипролина с мочой, его содержание в плазме/сыворотке крови зависят не столько от скорости синтеза коллагена и образования фибрилл, сколько от интенсивности распада коллагена. У молодых людей более высокий уровень гидроксипролина в моче вследствие более интенсивного обмена коллагена. С возрастом (особенно в старости) экскреция гидроксипролина заметно снижается, так как коллаген труднее расщепляется коллагеназой. Экскреция гидроксипролина увеличивается вследствие ускоренного распада коллагена при заболеваниях, связанных с поражением соединительной ткани (коллагенозы, гиперпаратиреоз, поражения костей, ревматизм и др.).

Содержание гидроксипролина в крови и моче наряду с активностью фермента коллагеназы отражают скорость катаболизма коллагена, поэтому их считают маркерами распада коллагена. Коллагенолитическая активность увеличивается при воспалении, в заживающих ранах.

В стоматологической практике повышенная концентрация гидроксипролина в крови и моче обнаруживается при тяжёлых формах пародонтоза. Повышенная активность коллагеназы обнаружена в тканях ротовой полости при периодонтите и пародонтозе. Имеются данные об

устойчивости коллагена зубного дентина к действию бактериальной коллагеназы при кариесе вследствие активного гликозилирования данного белка, что сопровождается снижением количества пролина и гидроксипролина в тканях зуба.

Оформление работы

Указывают принцип метода, регистрируют результаты, производят необходимые расчеты, делают заключение о наличии/отсутствии патологических отклонений.

Лабораторная работа 2 **Пробы на гликозаминогликаны в моче**

Актуальность

Гликозаминогликаны белково-углеводных комплексов составляют основное вещество матрикса соединительной ткани. При нарушении обмена в соединительной ткани активируются ферменты деградации основного вещества, из которых наиболее известна β -гиалуронидаза. Распад углеводного компонента протеогликанов способно катализировать множество лизосомальных гидролаз (α -нейраминидаза, β -галактозидаза, β -гексоаминидаза, α -маннозидаза, β -маннозидазы, α -фукозидаза, эндо- β -N-ацетилглюкозаминидаза, аспартилглюкозаминидаза и др.), в результате их действия возрастает содержание гликозаминогликанов в крови и моче. Генетически детерминированные дефекты ферментов приводят к нарушению деградации протеогликанов и накоплению продуктов их неполного распада в лизосомах, что становится причиной различных заболеваний.

Реактивы

1) 2,5 % раствор цетилтриметиламмонийбромид (ЦТАБ) в 1 М цитратном буфере, 2) 1 М цитратный буфер, pH 5,75 (21 г цитрата растворяют в небольшом количестве дист. воды в мерной колбе, добавляют 12 г NaOH, охлаждают, доводят дист. водой до 100 мл), 3) 0,1 % раствор толуидинового синего (0,25 г краски растворяют в 100 мл ацетона и 25 мл дист. воды), 4) 10 % раствор уксусной кислоты, 5) раствор хондроитинсульфата А (2 мг/мл).

Материал для исследования

Свежая моча.

ПРОБА С ЦЕТИЛТРИМЕТИЛАММОНИУМБРОМИДОМ

Принцип метода

Гликозаминогликаны при взаимодействии с цетилтриметиламмонийбромидом формируют преципитат, интенсивность образования и осаждения которого зависит от их содержания в исследуемой пробе мочи.

Ход работы

К 5,0 мл мочи прибавляют 1,0 мл 2,5 % раствора цетилтриметиламмонийбромид, инкубируют при комнатной температуре в течение 30 мин, наблюдая за образованием преципитата.

Оценка результатов

Пробу оценивают по шкале от 0 до 4+ (в соответствии с интенсивностью образования преципитата и характером осадка). Проба даёт до 40 % ложноположительных результатов.

ПРОБА С ТОЛУИДИНОВЫМ СИНИМ

Принцип метода

Гликозамингликаны, при появлении их в моче, способны взаимодействовать с красителем толуидиновым синим, образуя соединение пурпурной окраски.

Ход работы

Одну каплю мочи наносят на бумагу, высушивают при комнатной температуре. Бумагу помещают в раствор толуидинового синего на 1 мин, затем обесцвечивают фон, погружая лист в 10 % раствор уксусной кислоты. Контроль (раствор хондроитинсульфата А (2 мг/мл) или моча больного мукополисахаридозом) обрабатывают параллельно опытной пробе.

Оценка результатов

Реакция положительна при развитии пурпурной окраски и может свидетельствовать о наличии гликозаминогликанов в моче.

Клинико-диагностическое значение

Проба с ЦТАБ положительна при мукополисахаридозах (особенно выражена у детей с синдромами Гунтера, Гурлера), синдроме Марфана, множественных экзостозах, ревматоидном артрите, кретинизме, карциноматозе. Проба с толуидиновым синим чувствительнее, чем проба с ЦТАБ, поэтому её целесообразно использовать для анализа всех «положительных» образцов, образующих с ЦТАБ осаждающийся преципитат.

Оформление работы

Указывают принципы методов, регистрируют результаты, сравнивают их и делают вывод о наличии/отсутствии патологических отклонений.

Лабораторная работа 3

Оценка содержания гексоз гликопротеинов в сыворотке крови

Актуальность

Гликопротеины межклеточного матрикса имеют ковалентно присоединённые углеводные цепи гораздо меньшей длины, чем у протеогликанов. Моносахаридные остатки в составе олигосахаридных фрагментов гликопротеинов относятся к гексозам, в том числе присутствуют дезокси- и аминокгексозы. Из гликопротеинов соединительной ткани выделены N-ацетилгалактозамин и N-ацетилглюкозамин. Во время синтеза N-связанных гликопротеинов обычно обнаруживают глюкозу, но в зрелых гликопротеинах она отсутствует. Характерным сахаром N-связанных гликопротеинов является манноза. В концевых отделах гликопротеинов встречается фукоза, но наиболее частым терминальным сахаром считают N-ацетилнейраминовую кислоту, субтерминально к ней нередко расположена галактоза, которую также выделяют из состава корового олигосахаарида протеогликанов.

Гексозы важны для проявления структурных, соединительных, защитных, иммунных, регуляторных свойств гликопротеинов.

Принцип метода

Гликопротеины благодаря содержащимся в них гексозам проявляют способность осаждаться из сыворотки крови при действии 96% этанола. Освобождённые в результате последующего гидролиза гексозы взаимодействуют с орциновым реактивом, окрашивая раствор в жёлто-оранжевый цвет, интенсивность которого пропорциональна содержанию гексоз.

Реактивы

1) Этанол 96°, 2) 0,1 М раствор NaOH, 3) орциновый реактив, 4) стандартный раствор гексоз (1 г/л).

Материал для исследования

Сыворотка крови.

Ход работы

Готовят три пробы: опытную, стандартную и контрольную.

Опытная проба – в центрифужную пробирку помещают 0,1 мл сыворотки крови и 2,5 мл этанола, перемешивают, центрифугируют 15 мин при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость сливают, пробирку осторожно опрокидывают на 30-60 сек на фильтровальную бумагу. Оставшийся в пробирке осадок белка растворяют в 0,5 мл 0,1 М раствора NaOH. Затем осторожно(!) доливают 4,5 мл орцинового реактива, тщательно смешивают стеклянной палочкой.

Стандартную пробу готовят, добавляя к 0,1 мл стандартного раствора (1 г/л) гексоз 0,4 мл 0,1 М раствора NaOH и 4,5 мл орцинового реактива.

Контрольную пробу готовят путём добавления к 0,5 мл 0,1 М раствора NaOH 4,5 мл орцинового реактива.

Все пробирки помещают в кипящую водяную баню на 15 мин, охлаждают под проточной водой. Опыт и стандарт фотометрируют против контроля в диапазоне длин волн 500-560 нм (зелёный светофильтр) в кювете 10 мм.

Расчёт

Для расчёта результатов используют формулу:

$$C_{оп} = \frac{E_{оп} \cdot C_{ст}}{E_{ст}},$$

где: $C_{оп}$ – концентрация гексоз гликопротеинов в крови (г/л), $C_{ст}$ – концентрация гексоз в стандартном растворе (г/л), $E_{оп}$ и $E_{ст}$ – экстинкции опытной и стандартной проб.

Нормальные величины

Концентрация гексоз гликопротеинов в сыворотке крови 1,05-1,15 г/л.

Клинико-диагностическое значение работы

Традиционно полагают, что увеличение уровня гликопротеинов (гексоз гликопротеинов) в крови отражает лишь процессы деструкции соединительных тканей при патологических процессах воспалительного и иного характера. Однако, как выяснилось, в ответ на повреждения печень усиленно синтезирует гликопротеины, многие из которых участвуют в репарации. Обладая биологически активными группами (например, сиаловыми кислотами, способными инактивировать ряд биологических агентов), гликопротеины участвуют в защитных реакциях, направленных на ограничение патологического процесса, последствий повреждения тканей (компенсаторная реакция).

Оформление работы

Указывают принцип метода, фиксируют показания прибора, производят расчёты, сравнивают нормальные величины с полученными данными, делают вывод о наличии/отсутствии патологических отклонений.

Лабораторная работа 4

Определение количества сиаловых кислот в сыворотке крови

Сиаловые кислоты или N-ацетилнейраминовые кислоты играют важную роль в качестве строительных блоков гетерополисахаридов, входящих в состав гликопротеинов и гликолипидов. Сиаловые кислоты обычно являются концевыми остатками полисахаридных цепей гликопротеинов и гликолипидов. Гликолипиды встречаются в мембранах, главным образом, в плазматической. Гликопротеины содержатся в мембранах, цитозоле, жидкостях организма. Сиаловая кислота синтезируется из фосфоенолпирувата и N-ацетилманнозамина-6-фосфата. В сыворотке крови определяют только связанные сиаловые кислоты.

Принцип

При добавлении трихлоруксусной кислоты к сыворотке крови идет мягкий гидролиз с отщеплением сиаловых кислот от сиалогликопротеинов. Сиаловые кислоты при нагревании с уксусно-сернокислым реактивом дают буровато-розовую окраску, интенсивность которой пропорциональна их концентрации.

Материал для исследования

Сыворотка крови.

Реактивы

1) 10 % раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ), 2) уксусно-сернокислый реактив (реактив Гесса), 3) стандартный раствор сиаловых кислот (1 г/л).

Проведение анализа

Опытная проба. В центрифужную пробирку вносят 1 мл сыворотки крови, 1 мл 10 % раствора ТХУ, перемешивают, закрывают фольгой, помещают точно на 5 мин в кипящую водяную баню для гидролиза гликопротеинов и выделения сиаловых кислот, охлаждают, центрифугируют 3-5 мин при 1500 об/мин (или фильтруют через смоченный водой бумажный фильтр). Для проведения реакции на сиаловые кислоты переносят 0,4 мл надосадочной жид-

кости (фильтрата) в чистую пробирку, добавляют 5 мл реактива Гесса, закрывают фольгой, кипятят 15-20 мин (появляется буровато-розовая окраска), охлаждают.

Стандартная проба. Берут 0,4 мл стандартного раствора сиаловых кислот, обрабатывают с 5 мл реактива Гесса аналогично опыту.

Интенсивность окраски обеих проб измеряют на колориметре против реактива Гесса при длине волны 540 нм (зелёный светофильтр) в кювете 1 см.

Расчёт

При отсутствии стандартного раствора содержание сиаловых кислот в сыворотке крови можно выражать в условных единицах, для чего полученную величину экстинкции опытной пробы умножают на 1000. При наличии стандартного раствора расчёт результатов проводят по формуле:

$$C_{оп} = \frac{E_{оп} \cdot C_{ст}}{E_{ст}}$$

где: $C_{оп}$ – концентрация в крови сиаловых кислот гликопротеинов (г/л), $C_{ст}$ – концентрация сиаловых кислот в стандартном растворе (г/л), $E_{оп}$ и $E_{ст}$ – экстинкции опытной и стандартной пробы.

Нормальные величины

Сыворотка крови	135-200 условных единиц
	2,0-2,36 ммоль/л
	0,62-0,73 г/л

Практическое значение

Концентрация сиаловых кислот в крови повышается при воспалениях (эндокардит, остеомиелит), туберкулезе, лейкемии, нефрозе, лимфогранулематозе, поражении гепатоцитов, деструкции соединительной ткани (коллагенозы и др.); резко растёт при опухоли головного мозга, инфаркте миокарда. Снижение сиаловых кислот - при пернициозной анемии, гемохроматозе, болезни Вильсона и дегенеративных процессах в ЦНС.

Оформление работы

Указывают принцип метода, записывают результаты измерения, производят расчёт, сравнивают нормальные величины с полученными данными, делают вывод о наличии или отсутствии патологических отклонений.

Вопросы для самоконтроля

1. Типы соединительных тканей, их морфофункциональные особенности. Межклеточный матрикс, химический состав, роль в организме.
2. Фибриллярные белки. Специфика аминокислотного состава и структуры коллагена, синтез, посттрансляционная модификация и ферменты, фолдинг, созревание, распад. Роль аскорбата в синтезе. Типы и группы коллагена, функции, роль в минерализации.
3. Особенности строения и функций эластина, эластин и коллаген. Адгезивные и антиадгезивные белки внеклеточного матрикса, строение и функции, роль в межклеточных взаимодействиях. Сахара гликопротеинов (гексозы и сиаловые кислоты).
4. Протеогликаны матрикса, классы, роль, синтез и распад. Строение углеводного кора, гликозаминогликанов. Сборка надмолекулярных комплексов.
5. Коллагеновые болезни, мукополисахаридозы и другие патологии соединительной ткани. Матриксные металлопротеиназы, гликозидазы.
6. Пульпа зуба как вариант специализированной соединительной ткани. Химический состав, свойства, функции пульпы.
7. Представительство соединительной ткани в структурах пародонта.

КОСТНАЯ ТКАНЬ. ТВЁРДЫЕ ТКАНИ ЗУБА. МИНЕРАЛИЗАЦИЯ

Актуальность

Костная ткань и большинство тканей зуба относятся к плотной оформленной соединительной ткани. Альвеолярный отросток челюстной кости – часть скелета и подчиняется метаболическим закономерностям костной ткани. Особое место среди минерализованных тканей занимает эмаль в связи со спецификой происхождения, состава и функций. Межклеточное вещество специализированных видов соединительной ткани определяет их основные свойства. Важную функцию выполняют кальций-связывающие и адгезивные белки. Расположение нитей коллагена в матриксе твердых тканей обеспечивает выполнение главных функций этого белка – придавать тканям прочность на разрыв и обеспечивать минерализацию костей, зубного дентина, цемента и периодонтальной связки. Помимо органических веществ твердые ткани характеризуются высоким содержанием минералов, среди которых преобладают фосфорнокислые соли кальция в виде апатитов. Образование и распад минеральной фазы твердых тканей организма тесно связаны с индивидуальным обменом кальция, фосфора, других макро- и микроэлементов. Наиболее значимым микроэлементом, повышающим устойчивость апатитов, является фтор. Зубы – специализированный орган, где прямо соприкасаются закономерности «поведения» органических и минеральных веществ. Понимание взаимоотношений между обменом органических компонентов и минералов в тканях зуба далеко от совершенства, на что указывают нерешённые проблемы борьбы с кариесом, воспалительными и иными заболеваниями полости рта.

Цель

1. Сформировать представление о химическом составе костной ткани и тканей зуба, зависимости характеристик кристаллов гидроксиапатита от состояния минерального обмена.
2. Освоить методы выявления основных неорганических веществ и белка в костной и зубных тканях, оценки концентрации кальция и фосфатов в плазме крови и моче.
3. Оценить проницаемость эмали зуба, акцентировать внимание на роли фтора в поддержании здоровья эмали, содержании фторидов в воде.

Вопросы для самоподготовки

1. Происхождение, состав, построение, функциональная организация костной ткани. Сходство и различия кости, соединительной и хрящевой тканей.
2. Комплексы протеогликанов матрикса кости, фибриллярные белки и гликопротеины различной природы. Коллагены и специфичные для костной ткани матриксные белки, посттрансляционная модификация, назначение, функции.
3. Механизмы моделирования и ремоделирования кости, роль ферментов и простагландинов, особенности процессов в альвеолярном отростке челюстной кости. Влияние пирофосфата и бифосфонатов на резорбцию кости.
4. Регуляция метаболизма кости и зубных тканей с участием витаминов (А, С, К, D), гормонов (паратгормон, кальцитонин, глюкокортикоиды, половые, тиреоидные и др.), белковых факторов (морфогены, митогены, факторы хемотаксиса и хемотракции, кейлоны).
5. Рахит (ранние и поздние проявления). Остеомаляция. Остеопороз и его виды. Причины появления, сходство и различия заболеваний.
6. Происхождение, функциональная организация и взаимосвязи тканей зуба.
7. Сходство и различия кости и зубного цемента. Виды цемента, роль, химический состав, специфические белки, возможности регенерации.
8. Химический состав и функции дентина. Виды дентина (плащевой, интертубулярный и перитубулярный), происхождение, функции, особенности минерализации. Сходство и различия первичного, вторичного и третичного дентина. Дентинные каналы. Дентинная жидкость: состав, происхождение, значение для тканей зуба.

9. Химический состав зубной эмали. Эмбриональная эмаль: синтез, созревание, значение наносфер, участие белков и ферментов в разные фазы образования эмали. Белки зрелой эмали. Факторы, влияющие на устойчивость и проницаемость эмали. Эмалева жидкость.
10. Коллаген, неколлагеновые белки кости и зуба, роль в минерализации. Роль органических молекул (фосфолипидов, цитрата и др.) в накоплении Са, появлении первичных кристаллов в ходе минерализации. Щелочная фосфатаза.
11. Теории минерализации кости и твёрдых тканей зуба. Гомогенная и гетерогенная нуклеация. Роль клеток в накоплении минералов и минерализации, матриксные пузырьки. Факторы, влияющие на процессы кристаллизации.
12. Кальций и фосфат межклеточного матрикса, функции, обмен. Фосфаты кальция - основа минеральной фазы (витлокит, монетит, брушит; ди-, три-, тетракальцийфосфаты, октакальцийфосфат, апатиты). Магний в организме, участие в минеральной фазе (струвит, невберит, апатит) твёрдых тканей.
13. Минеральные компоненты аморфной фазы твердых тканей, этапы преобразования в гидроксиапатит (ГАП). Типы кристаллов. Сравнение кристаллов ГАП кости и тканей зуба. Механизм формирования кристаллов ГАП в эмали.
14. Условия образования вакансий, этапы изоморфного замещения элементов кристаллической решетки, роль в модификации апатитов. Механизмы и реакции поступления, последствия включения макро- и микроэлементов в кристаллы ГАП кости и твёрдых тканей зуба. Рахитоподобные состояния, «уровская болезнь» (Кашина-Бека) и другие патологии.
15. Фтор, роль в процессах жизнедеятельности. Источники фтора и потребность в нём. Влияние фтора на ткани зуба. Гипофтороз, флюороз зубов.
16. Поверхностные образования на зубах (кутикула, пелликула, зубной налёт): состав, механизмы образования. Роль микрофлоры в синтезе стромы налёта (декстраны, леваны, маннаны и др.), углеводно-фосфорный обмен в бляшке. Минерализации зубной бляшки, разнообразие минералов зубного камня.
17. Кариес. Причины, механизмы развития, профилактика. Особенности биохимических нарушений в разных тканях зуба.
18. Состояние зубов и питание: углеводы, белки, витамины и микроэлементы.

Лабораторная работа 1

Обнаружение белка и минеральных компонентов в костной ткани и тканях зуба

Межклеточный матрикс минерализованных тканей содержит белки и сульфатированные гликозаминогликаны. Главный белок кости, дентина и цемента зуба – коллаген, также представлены адгезивные и антиадгезивные гликопротеины и Са-связывающие белки. Зубная эмаль содержит специфичные белки, нерастворимые в ЭДТА и HCl – производные эмбриональных энамелинов и амелобластинов. Для поддержания структурно-функционального статуса кости и зуба важна минеральная фаза, распределенная в органической в виде тончайших включений. Их отличает высокая концентрация минералов (фосфаты Са и Mg, карбонаты Са, фторид Са и др.), в основном это кристаллы ГАП.

Материал для исследования

- 1) Минерализаты кости и тканей зуба (готовят лаборанты: гомогенизируют в ступках костную ткань и зубные ткани, 5 г порошка кости или зуба инкубируют во флаконах с 25 мл 0,5 % раствора H₂SO₄ в течение суток, отфильтровывают осадок);
- 2) гидролизаты кости и тканей зуба (готовят студенты на занятии).

Реактивы

- 1) Молибденовый реактив, 2) 10 % раствор уксусной кислоты, 3) насыщенный раствор щавелевокислого аммония, 4) 10 % раствор HCl, 5) 5 % раствор BaCl₂, 6) 10 % раствор NaOH, 7) 1-2 % раствор CuSO₄.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАЛИЧИЯ КАЛЬЦИЯ В МИНЕРАЛИЗАТАХ КОСТИ И ЗУБА

Принцип метода

Кальций минерализата кости/зуба (CaHPO_4) при добавлении щавелевокислого аммония выпадает в осадок в виде оксалата кальция (CaC_2O_4).

Проведение анализа

К 3-4 мл минерализата приливают 5-7 капель 10 % раствора уксусной кислоты и 10-20 капель насыщенного раствора $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$. В осадок выпадают кристаллы щавелевокислого кальция. При отсутствии осадка добавить $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАЛИЧИЯ МАГНИЯ В МИНЕРАЛИЗАТАХ КОСТИ И ЗУБА

Принцип метода

Магний минерализата кости/зуба (MgHPO_4) при медленном добавлении раствора аммиака выпадает в осадок в виде фосфата магний-аммония (MgNH_4PO_4).

Проведение анализа

Щавелевокислый кальций, полученный в предыдущем опыте, отделяют фильтрованием, в прозрачном фильтрате остается MgHPO_4 . К фильтрату добавляют по каплям концентрированный раствор аммиака (7-10 капель). Выпадает осадок фосфата магний-аммония (MgNH_4PO_4). При необходимости добавляют аммиак.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАЛИЧИЯ ФОСФАТОВ В МИНЕРАЛИЗАТЕ КОСТИ И ЗУБА

Принцип метода

Фосфаты минерализата кости (или тканей зуба) при реакции с молибденовым реактивом образуют жёлтый кристаллический осадок фосфорномолибденовокислого аммония $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{MoO}_3$.

Проведение анализа

В пробирку наливают 5-10 капель молибденового реактива и нагревают над пламенем спиртовки до закипания (не кипятить!). Затем добавляют 2-3 мл профильтрованного минерализата кости (зуба). Постепенно выпадает жёлтый осадок фосфорномолибденовокислого аммония.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАЛИЧИЯ СУЛЬФАТОВ В МИНЕРАЛИЗАТАХ КОСТИ И ЗУБА

Принцип метода

В кислой среде сульфаты минерализата кости/зуба образуют с хлористым барием белый осадок BaSO_4 .

Проведение анализа

К 1 мл минерализата приливают 10 капель 10 % раствора HCl и медленно по каплям добавляют раствор BaCl_2 до образования осадка. Осадок отфильтровывают. Фильтрат нагревают и кипятят над пламенем спиртовки 2-3 мин. При этом снова появляется муть вследствие освобождения серной кислоты из солей эфирсерных кислот.

ОБНАРУЖЕНИЕ БЕЛКОВ В ГИДРОЛИЗАТАХ КОСТИ И ТКАНЕЙ ЗУБА

Принцип метода

При гидролизе белкового компонента кости, тканей зуба образуются фрагменты белков и свободные пептиды, вступающие в характерную биуретовую реакцию, когда пептидные связи в щелочной среде формируют с ионами меди комплексное соединение фиолетового цвета.

Проведение анализа

Для приготовления гидролизатов костной и зубных тканей сначала гомогенизируют образцы твёрдых тканей. С этой целью измельчают по отдельности небольшой кусочек кости и небольшой кусочек зуба, далее в отдельных ступках тщательно растирают оба образца до го-

могеного порошкообразного состояния. С помощью сухой воронки полученный порошок костной ткани переносят в 1-ю пробирку, порошок тканей зуба переносят во 2-ю пробирку. В каждую пробирку добавляют по 10 капель 10 % раствора NaOH, перемешивают, закрывают фольгой, помещают в кипящую водяную баню, нагревают до кипения и прогревают 1 мин. Белки при этом подвергаются щелочному гидролизу. Гидролизаты охлаждают под проточной водой и проводят качественную реакцию на белковый компонент: в пробирки к гидролизату костной ткани и к гидролизату тканей зуба добавляют по 1-2 капли раствора CuSO₄. Появление фиолетового окрашивания, характерного для биуретовой реакции, указывает на наличие белка в исходном субстрате.

Оформление работы

Фиксируют принципы методов, результаты реакций, сравнивают полученные данные с теоретическими предпосылками, делают заключение о наличии минеральных составляющих и белковых веществ в костной ткани и тканях зуба.

Лабораторная работа 2

Определение концентрации кальция в сыворотке крови и моче

Актуальность

Биологическое значение кальция очень разнообразно. Он участвует в формировании костей, зубов, хрящей, влияет на проницаемость биологических мембран, нервно-мышечную возбудимость и проводимость, участвует в сокращении и расслаблении сердца и скелетной мускулатуры, секреторных процессах, воздействует на обмен веществ, является посредником действия гормонов и важным фактором свёртывания крови.

Концентрация кальция в плазме крови отражает его содержание в организме и состояние костной ткани. Гипокальциемия приводит к нарушению минерализации костей, поскольку в этом случае кальций начинает вымываться из депо, каковым для кальция в организме является скелет. Минерализованные ткани зуба также вовлекаются в этот процесс. Одновременно нарушается реминерализация эмали вследствие влияния концентрации кальция в плазме крови на содержание кальция в слюне.

Реактивы

1) 4 % раствор щавелевокислого аммония, 2) 2 % раствор аммиака, 3) 0,5 моль/л раствор H₂SO₄, 4) 0,01 моль/л раствор марганцевокислого калия, 5) рабочий реагент, содержащий арсенazo-III в ацетатном буфере, 6) 2,5 ммоль/л стандартный раствор кальция углекислого.

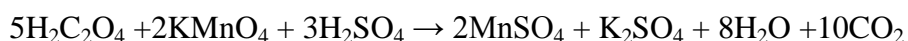
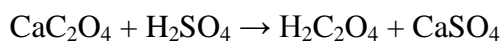
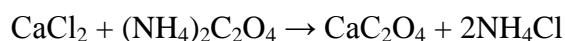
Материал для исследования

1) Сыворотка крови, 2) свежая моча.

ТИТРОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД

Принцип метода

Метод основан на осаждении кальция из сыворотки крови в виде оксалата кальция. Оксалат кальция разлагается серной кислотой при нагревании с образованием щавелевой кислоты, которую оттитровывают перманганатом калия. Содержание кальция пропорционально количеству щавелевой кислоты.



Проведение анализа

В центрифужную пробирку приливают 1 мл сыворотки крови и 1 мл дистиллированной воды (опыт), в другую центрифужную пробирку – 2 мл дистиллированной воды (контроль). В обе пробирки добавляют по 0,5 мл раствора щавелевокислого аммония, слегка встряхивают и инкубируют при комнатной температуре 30 мин, после чего центрифугируют в течение

5 мин при 3000 об/мин и удаляют надосадочную жидкость. В опытной пробирке на дне остаётся белый осадок оксалата кальция. В обе пробирки наливают по 2 мл раствора аммиака для удаления избытка щавелевокислого аммония. Затем пробирки вновь центрифугируют в течение 5 мин и повторно удаляют надосадочную жидкость. В обе пробирки вносят по 1 мл раствора серной кислоты для растворения осадка, слегка размешивают стеклянной палочкой и помещают в нагретую водяную баню на 2 мин. Содержимое пробирок титруют раствором перманганата калия до появления слабозимовой окраски, не исчезающей в течение минуты.

Расчёт

Расчёт содержания кальция в пробе проводят по формуле:

$$Ca = (A - B) \cdot 0,005 \cdot 1000 ,$$

где: Ca – концентрация кальция в сыворотке крови, ммоль/л, A – объём раствора KMnO₄, пошедший на титрование опытной пробы, мл;

B – объём раствора KMnO₄, пошедший на титрование контроля, мл;

0,005 - количество Ca, соответствующее 1 мл 0,01 М KMnO₄, моль;

1000 - коэффициент для пересчёта на 1 л сыворотки крови.

КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД

Принцип

В кислой среде ионы кальция образуют с индикаторным реактивом арсенazo-III комплекс малинового цвета. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации кальция в пробе и определяется колориметрически.

Проведение анализа

Готовят три пробы согласно таблице:

	Опыт 1, мл	Опыт 2, мл	Контроль, мл
Сыворотка	0,02	-	-
Моча	-	0,02	-
Стандартный раствор	-	-	0,02
Рабочий реагент	2,0	2,0	2,0
	Пробы перемешивают, измеряют оптическую плотность проб против воды в кювете 0,5 см при длине волны 650-670 нм (красный светофильтр)		

Расчёт

Содержание кальция в сыворотке крови рассчитывают по формуле:

$$C_{оп} = \frac{E_{оп} \cdot C_{ст}}{E_{ст}} ,$$

где: C_{оп} – концентрация кальция в сыворотке крови (ммоль/л), C_{ст} – концентрация кальция в стандартном растворе (ммоль/л), E_{оп} – экстинкция опытной пробы, E_{ст} – экстинкция стандарта.

Содержание кальция в моче рассчитывают по формуле:

$$C_{оп} = \frac{E_{оп} \cdot C_{ст}}{E_{ст}} \cdot D ,$$

где: C_{оп} – концентрация кальция в моче (ммоль/сут), C_{ст} – концентрация кальция в стандартном растворе, E_{оп} – экстинкция опытной пробы, E_{ст} – экстинкция стандарта, D – диурез (1300-1500 мл/сут).

Нормальные величины

Сыворотка	2,0–2,6 ммоль/л
Моча	2,5–7,5 ммоль/сут

Практическое значение

Содержание общего кальция в крови повышается при избытке паратгормона, гипервитаминозе D, идиопатической чувствительности к витамину D, деструкции костей, злокачественных опухолях с поражением костной ткани и без такового, тиреотоксикозе, акромегалии, лейкозах, миеломной болезни, ацидозе. Гипокальциемия выявляется при гиповитаминозе D (недостаток всасывания, реабсорбции и резорбции кальция), нарушении всасывания, недостаточности паратгормона, остром панкреатите, гипотиреозе, хронической почечной недостаточности, прогрессирующей остеомаляции, сепсисе (выход через нарушенную систему микроциркуляции), алкоголизме, циррозе печени, гипоальбуминемии, остром алкалозе (усиление связывания кальция с белками). Кальцитонин снижает содержание кальция в крови, ограничивая резорбцию костной ткани.

Содержание кальция в моче возрастает при метастазах рака или саркомы в кости и при состояниях организма, сопровождающихся гиперкальциемией. Снижение уровня кальция в моче отмечается во всех случаях снижения его содержания в сыворотке, при нефрозах, остром нефрите, дефиците витамина D.

Оформление работы

Указывают принцип метода, фиксируют результаты, делают расчёты, формулируют вывод о содержании Са в сыворотке крови и моче, наличии/отсутствии патологических отклонений, отмечают клинико-диагностическое значение.

Лабораторная работа 3

Определение концентрации неорганических фосфатов в сыворотке крови и моче

Актуальность

Обмен фосфора тесно связан с обменом кальция, что особенно важно для поддержания функционирования костной и зубных тканей. Для диагностики патологических состояний существенное значение имеет установление соотношения между содержанием кальция и неорганических фосфатов в крови (норме они соотносятся как 2 : 1).

Уровень фосфатов в крови зависит от функции паращитовидных желёз, содержания соматостатина и вазопрессина, от регулирующего действия витамина D и функции почек. Для поддержания кальций-фосфорного обмена очень важен процесс выведения этих минералов из организма, осуществляемый преимущественно почками и имеющий неоднозначную гормональную регуляцию. Потеря фосфатов с мочой может превалировать над выведением кальция.

Принцип метода

Фосфорная кислота безбелкового фильтрата сыворотки крови (мочи) реагирует с ванадатом и молибдатом аммония с образованием фосфорнованадиево-молибденовой кислоты, имеющей характерную жёлтую окраску. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации неорганического фосфата в исследуемой пробе сыворотки крови или мочи и определяется фотометрически.

Реактивы

1) 10 % раствор трихлоруксусной кислоты, 2) рабочий раствор, содержащий 1 ммоль/л аммония молибдата и 1 ммоль/л аммония ванадата, 3) стандартный раствор, содержащий 2,5 ммоль/л KH_2PO_4 .

Материал для исследования

Сыворотка крови, моча (разведение 1 : 5).

Проведение анализа

Сначала в центрифужных пробирках готовят безбелковый фильтрат сыворотки крови (мочи). Далее вторую часть работы с полученной надосадочной жидкостью (фильтратом) проводят в химических пробирках.

Реагенты	Опыт 1	Опыт 2	Стандарт
Сыворотка	0,2	–	–
Моча, разведение 1 : 5	–	0,2	–
Стандартный раствор	–	–	0,2
Дистилл. вода	0,6	0,6	0,6
ТХУ	0,8	0,8	0,8
	Перемешивают, через 5-8 мин фильтруют или центрифугируют 10 мин при 1500–2500 об/мин		
Супернатант	0,8	0,8	0,8
Рабочий раствор	1,0	1,0	1,0
	Перемешивают, инкубируют 20 мин, измеряют оптическую плотность опытных проб и стандарта против воды при длине волны 670 нм (красный светофильтр)		

Расчёт

Содержание фосфатов в сыворотке крови рассчитывают по формуле:

$$C_{оп} = \frac{E_{оп} \cdot C_{ст}}{E_{ст}},$$

где: $C_{оп}$ – концентрация фосфатов в сыворотке крови (ммоль/л), $C_{ст}$ – концентрация фосфатов в стандартном растворе (2,5 ммоль/л), $E_{оп}$ – экстинкция опытной пробы, $E_{ст}$ – экстинкция стандарта.

Содержание фосфатов в моче рассчитывают по формуле:

$$C_{оп} = \frac{E_{оп} \cdot C_{ст}}{E_{ст}} \cdot 5 \cdot D,$$

где: $C_{оп}$ – концентрация фосфатов в моче (ммоль/сут), $C_{ст}$ – концентрация фосфатов в стандартном растворе, $E_{оп}$ – экстинкция опытной пробы, $E_{ст}$ – экстинкция стандарта, 5 – разведение мочи, D – диурез (1300-1500 мл/сут).

Нормальные величины

Сыворотка	0,81-1,48 ммоль/л
Моча	25,8-48,4 ммоль/сут

Практическое значение

Концентрация неорганических фосфатов в сыворотке крови и моче зависит, прежде всего, от функции паращитовидных и щитовидных желез, почек, регулирующей роли кальцитриола.

Гиперфосфатемия наблюдается при почечной недостаточности, гипертиреозе, гипопаратиреоидизме, акромегалии, заживлении костных переломов, метастазах в кости, передозировке витамина D, остром дыхательном ацидозе, миеломной болезни. *Гипофосфатемия* отмечается при инфузии глюкозы и гиперинсулинизме (инсулин способствует транспорту фосфора в клетки), диабетическом кетоацидозе (глюкозурия повышает экскрецию фосфатов с мочой), гипокалиемии, гиперпаратиреозе, микседеме, рахите, остеомалации, остром алкоголизме, синдроме мальабсорбции, пеллагре.

Выделение фосфатов с мочой *возрастает* на фоне ускорения катаболизма – гипертиреоз, менингит, диабетический кетоацидоз, лейкоз, нарушение функции почек. *Снижение* концентрации фосфатов в моче отмечается при туберкулезе, гипофункции паращитовидных желез.

Оформление работы

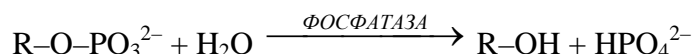
Указывают принцип метода, фиксируют результаты исследования, делают расчёты, отмечают диагностическое значение показателя и делают выводы о возможной патологии. Полученные на занятии данные о содержании кальция и фосфатов в биожидкостях оценивают, используя заполненную таблицу 2 (см. задания для контроля усвоения темы). Обсуждают

роль гормонов в регуляции (кальцитриол, паратирин, кальцитонин), синергизм и антагонизм их действия в обмене кальция и фосфатов, значение для здоровья твердых тканей

Лабораторная работа 4

Определение активности щелочной фосфатазы в плазме крови и ротовой жидкости

Щелочная фосфатаза (ЩФ) – фосфогидролаза моноэфиров фосфорной кислоты, имеет 5 тканеспецифичных изоферментов: костный, кишечный, почечный, плацентарный, печеночный. Наиболее высока активность фермента, соответственно, в остеобластах, эпителии тонкого кишечника и канальцев почек, предстательной и молочной железах, плаценте, печени. Фракции ЩФ распределены в организме неравномерно, отличаются по каталитическим свойствам, подвижности при электрофорезе, устойчивости к тепловой инактивации. Изоформы ЩФ путём гидролиза высвобождают неорганический фосфат из органических соединений (фосфоэтанолламин, пиридоксальфосфат, β-глицерофосфат, пиррофосфат и др.):



ЩФ, выходя из клеток в плазму крови, образует комплексы с белками и липидами.

Принцип метода

Метод основан на способности щелочной фосфатазы гидролизовать фосфоэфирную связь в субстрате (п-нитрофенилфосфат) с освобождением п-нитрофенола, дающего в щелочной среде жёлтое окрашивание, интенсивность которого пропорциональна активности фермента и определяется колориметрически после остановки ферментативной реакции ингибитором.

Необходимые реактивы

1) Субстратно-буферный раствор для определения активности щелочной фосфатазы, pH 10,5 (готовят перед занятием), 2) раствор 4-нитрофенилфосфата (субстрат), 3) буферный раствор, 4) раствор пара-нитрофенола (стандарт), 5) 0,02 N раствор NaOH, 6) раствор ингибитора.

Материалы для исследования

Смешанная слюна, плазма крови.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТА В ПЛАЗМЕ КРОВИ

Проведение анализа

Реагенты, мкл	Опыт	Контроль
Буферный раствор	1000	1000
Плазма/сыворотка крови	20	–
	Инкубируют при 37°C в течение 5 минут	
Раствор субстрата	200	200
	Инкубируют при 37°C в течение 10 минут	
Раствор ингибитора	500	500
Стандартный раствор	–	20
Перемешивают и измеряют экстинкцию проб против воды при длине волны 405 нм (400-420 нм, сине-фиолетовый с/фильтр) в кювете 10 мм		

Расчёт

Активность щелочной фосфатазы находят по формуле:

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

где: $E_{\text{оп}}$ и $E_{\text{к}}$ – оптическая плотность опыта и контроля, 10,263 – коэффициент пересчёта в единицы СИ.

Нормальные величины

Плазма крови 0,90-2,29 мккат/л = 278-830 ммоль/(с·л) = 0,02-0,05 МЕ

Практическое значение

Повышение активности щелочной фосфатазы в крови наблюдается при костных заболеваниях (переломы, остеопороз, рахит, размягчение костной ткани, доброкачественные и злокачественные костные опухоли, миеломная болезнь, лимфогранулематоз с поражением костей, деформирующее поражение кости при болезни Педжета – активность фермента выше нормы в 20 раз и более), при заболеваниях печени с явлениями холестаза (механическая желтуха – повышение в 5-10 раз, холангит, холангиолит, цирроз печени, острая жёлтая дистрофия печени и др.), при заболеваниях почек рост активности щелочной фосфатазы связан с нарушением метаболизма витамина D, вторичным гиперпаратиреозом.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТА В РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ

Щелочную фосфатазу секретирует подъязычная железа, фермент может иметь лейкоцитарное и бактериальное происхождение, хорошо работает в нейтральной среде, но оптимум рН 9,1-10,5. Фермент участвует в минерализации и реминерализации эмали, обеспечивая образование и поступление неорганического фосфата HPO_4^{2-} в ткани зуба. Активность щелочной фосфатазы слюны коррелирует с минерализующей активностью ротовой жидкости. Здесь также присутствует несколько изоферментов кислой фосфатазы, секретируемых околоушными железами, однако они проявляют максимальную активность в более кислой среде (оптимум рН 4,8) при скоплении микроорганизмов в полости рта.

Проведение анализа

	Опыт, мл	Контроль, мл
Субстратно-буферный раствор	1,0	1,0
	Инкубируют 5 мин при 37°C	
Ротовая жидкость	0,1	–
	Перемешивают, инкубируют 30 мин при 37°C	
Раствор едкого натра	4,0	4,0
Стандартный раствор	–	0,1
Колориметрируют опыт против контроля при длине волны 405 нм (сине-фиолетовый светофильтр) в кювете 10 мм.		

Расчёт

Содержание пара-нитрофенола (мкмоль) в опытной пробе находят по прилагаемому калибровочному графику. Активность щелочной фосфатазы рассчитывают по формуле, выражая в микромолях пара-нитрофенола, освободившегося под влиянием 1 мл слюны за 1 час инкубации при 37 °С.

$$\text{Активность ЩФ [мкмоль/(мл · ч)]} = \frac{A \cdot 2}{0,1},$$

где А – содержание п-нитрофенола в пробе, найденное по калибровочному графику (мкмоль); 0,1 – коэффициент пересчёта на 1 мл слюны; 2 – коэффициент пересчёта на 1 час инкубации.

Практическое значение

Щелочная фосфатаза слюны участвует в минерализации и реминерализации эмали, обеспечивая накопление неорганического фосфата (HPO_4)²⁻. Активность фермента повышается при воспалении мягких тканей полости рта, пародонтите, у лиц с металлическими зубными протезами из нержавеющей стали.

Оформление работы

Указывают принцип метода, фиксируют результаты, делают расчёты и выводы о наличии/отсутствии патологических отклонений, описывают клиническое значение.

Лабораторная работа 5

Оценка проницаемости зубной эмали

Актуальность

Эмаль зуба имеет свойства полупроницаемой мембраны, проницаемость которой зависит от физико-химических особенностей среды, окружающей зуб. Между эмалью и ротовой жидкостью идёт ионный обмен. В нормальных условиях в результате этого процесса, который, начинается в момент прорезывания зуба и продолжается всю жизнь, происходит минерализация («созревание») эмали, вследствие чего значительно снижается её проницаемость. pH среды и деминерализация эмали – очень важные взаимосвязанные факторы, влияющие на проницаемость эмали. Зубной налёт увеличивает проницаемость эмали. В ротовой полости идут два противоположно направленных процесса: накопление кислых продуктов в ходе ферментации углеводов и накопление щелочных продуктов вследствие утилизации азотосодержащих веществ. Проницаемость эмали возрастает, главным образом, за счёт органических кислот, образующихся из углеводов микрофлорой зубного налёта и скапливающихся под бляшками на поверхности зуба. При увеличении содержания кислот ионы водорода проникают внутрь кристаллов гидроксиапатита, обмениваясь на выходящий из эмали Ca^{2+} . Органические кислоты – одна из причин деминерализации при кариесе и некариозных поражениях твердых тканей зуба.

Принцип метода

Зубная эмаль окрашивается метиленовым синим в силу способности избирательно пропускать разные вещества. По интенсивности окраски судят об изменении проницаемости эмали под действием кислот, щелочей.

Реактивы

1) 10 % раствор HCl, 2) 10 % раствор NaOH, 3) 1 % раствор метиленовой сини.

Материал для исследования

Зубы (с целой эмалью) человека или животного.

Проведение анализа

Выбирают три приблизительно одинаковых участка на поверхности эмали зуба, обводят простым карандашом и обрабатывают с помощью маленьких ватных тампонов, смоченных соответствующим реактивом: первый участок – 10 % раствором соляной кислоты, второй – 10 % раствором NaOH, третий (контрольный) – дистиллированной водой (важно! тампоны не должны соприкасаться). Время экспозиции – 20 минут. Эмаль просушивают и 3 минуты обрабатывают 1 % раствором метиленовой сини, используя пинцет с ватным тампоном. Подсушивают и наблюдают различную интенсивность окрашивания изучаемых участков эмали зуба.

Практическое значение

Под влиянием кислот, образующихся при ферментации простых углеводов микрофлорой зубного налёта, нарушается ионный обмен эмали, повышается её растворимость и проницаемость для различных групп веществ, что сопровождается активацией деминерализации, развитием кариеса, разрушением зуба.

В стоматологической практике в случае некариозных поражений твердых тканей зуба при обследовании больного используется витальное окрашивание эмали (5 % спиртовой настойкой йода, 2 % раствором метиленовой сини) в качестве одного из дополнительных методов. На основе результатов теста подсчитывают индекс реминерализации для оценки степени минерализации твердых тканей зуба.

Методика проведения теста. Очищенную от зубного налёта и высушенную поверхность некариозного поражения или пятна смазывают 5% настойкой йода, который проникает в ткани зуба при снижении их минерализации, окрашивая очаг поражения в жёлто-коричневый цвет. Степень окрашивания оценивают сразу же, поскольку йод очень летуч и быстро испаряется.

Коды оценки результатов теста: 1 – отсутствие окрашивания, 2 – светло-жёлтое окрашивание, 3 – от тёмно-жёлтого до светло-коричневого окрашивания, 4 – тёмно-коричневое окрашивание.

Расчёт индекса реминерализации (ИР) производят по формуле:

$$ИР = \frac{\text{Сумма оценок зубов с некариозными поражениями}}{\text{Число зубов с некариозными поражениями}}$$

Критерии диагностики по результатам теста (в баллах):

- 1 - преобладают процессы реминерализации,
- 2 - имеются процессы реминерализации,
- 3 - имеются процессы деминерализации,
- 4 - преобладают процессы деминерализации.

Примечание. К некариозным поражениям, которые возникают до прорезывания зубов, относят гипо- или гиперплазию эмали и дентина, эндемический флюороз зубов, наследственные нарушения развития твёрдых тканей зуба, медикаментозные и токсические нарушения развития тканей зуба. К некариозным поражениям, возникающим после прорезывания зубов, относят пигментации (дисколориты) зубов, налёты на зубах, клиновидный дефект, эрозию или некроз эмали, медикаментозные и токсические нарушения развития тканей зуба, гиперестезию эмали и дентина, стираемость твёрдых тканей зуба, травму зуба.

Оформление работы

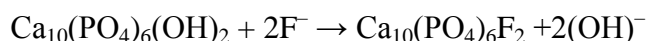
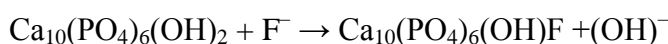
Указывают принцип метода, сравнивают полученные результаты. Делают вывод о влиянии кислот и щелочей на проницаемость эмали.

Лабораторная работа 7

Определение концентрации фторидов в питьевой воде

Актуальность

Недостаточное содержание фторидов в водопроводной воде приводит к нехватке фтора в организме. Результатом недостатка фтора в слюне становится снижение включения ионов F^- в кристаллы апатитов эмали, что уменьшает её микротвёрдость и кислотоустойчивость. Поступление малых количеств фтора в поверхностные слои эмали необходимо для формирования кристаллов гидроксифторапатита и фторапатита:



Ионы F^- среди всех прочих ионов имеют максимальную способность к замещению ионов OH^- в апатитах в силу того, что у них очень близки ионные радиусы, одинаковы заряд и степень гидратации. Облегчает подобный обмен способность ионов фтора легко диффундировать в гидратный слой кристаллов ГАП и обратно. Именно этот слой содержит мобильные запасы фтора – до 15 %. Хотя дальнейшее проникновение ионов фтора во внутренние слои кристаллической решётки происходит гораздо медленнее, возврат оттуда в гидратную оболочку и наружу затруднён ещё больше. Повышенная прочность фторапатитов обусловлена свойствами ионов фтора: связь с кристаллической решёткой крепче ионов OH^- , препятствуют диффузии H^+ внутрь эмали, ограничивают выход ионов Ca^{2+} и PO_4^{2-} из кристалла наружу. Тотального изоморфного замещения ионов OH^- ионами F^- в кристаллической решётке апатитов не происходит. Фторсодержащих апатитов в эмали в норме около 0,4-0,66 %, они более резистентны к растворению в кислой среде, чем ГАП. При замещении фтором даже 1 из 50 гидроксильных групп растворимость эмали резко понижается. Такие замены повышают кариесорезистентность эмали и относятся к протекторным, с ними связано профилактическое действие малых концентраций фтора. Уровень фтора в эмали постоянных зубов по отношению к таковому в молочных растёт с увеличением содержания F^- в воде.

Принцип метода

Метод основан на образовании растворимого в воде тройного комплекса сиренево-синего цвета, в состав которого входит лантан, ализарин-комплексон и фторид, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации фторидов в воде. Для повышения оперативности измерения оптической плотности определение проводят в водно-ацетоновой среде, в которой полнота развития окраски тройного комплекса достигается через 15 мин. Алюминий и железо сильно мешают определению фторидов, связывая их в комплекс и занижая результаты. Допустимая массовая концентрация алюминия не выше 0,2 мг/л, железа — не выше 0,7 мг/л. Фотометрический метод с лантан-ализарин комплексоном в водно-ацетоновой среде используют для оценки количества фторидов в воде при их содержании в диапазоне концентраций 0,04-0,60 мг/л.

Реактивы

1) Раствор 1 (0,1 М ацетатный буфер (рН 7,4) и азотнокислый лантан, соотношение 1:5), 2) раствор 2 (ализарин комплексон и ацетон, соотношение 6,5:11), 3) рабочий раствор (*ex tempore*: смесь 6,4 мл раствора 1 и 18,6 мл раствора 2).

Калибровочный график на фториды лаборанты готовят заранее.

Материал для исследования

Пробы водопроводной воды.

Проведение анализа

Отбор пробы воды. Объем пробы воды для двух параллельных определений должен быть не менее 100 мл. Пробу отбирают в полиэтиленовую посуду и не консервируют. При необходимости пробу хранят в холодильнике и анализируют не позднее чем через 3 суток.

Анализ проб воды. В мерную колбу на 50 мл помещают 25 мл анализируемой воды (если массовая концентрация фторидов больше 0,6 мг/л, то берут 10,0 мл или меньший объем, доводят его до 25 мл), приливают 25 мл рабочего раствора (до метки), перемешивают, инкубируют 15 мин. Колориметрируют в диапазоне длин волн 590-610 нм в кювете 50 мм относительно контроля (рабочий раствор). Массовую концентрацию фторидов в воде находят по калибровочному графику и выражают в мг/л. За окончательный результат анализа принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений.

Нормальные величины

Оптимальное содержание фторидов в питьевой воде 0,5-1,0 мг/л.

Практическое значение

Содержание фторидов в питьевой воде играет одну из главных ролей в распространённости кариеса среди населения. Потребление питьевой воды, где фторидов менее 0,5 мг/л, приводит к высокому уровню поражения зубов кариесом у всех групп населения. К методам профилактики заболеваемости кариесом относят фторирование источников питьевой воды в регионах с низким содержанием фторидов в воде и окружающей среде в целом. Наряду с этим для профилактики кариеса полезно применять F-содержащие зубные пасты.

Оформление работы

Указывают принцип метода, фиксируют данные, производят расчёты по прилагаемому калибровочному графику, сравнивают результат с оптимальными значениями, делают выводы.

Лабораторная работа 8

Влияние сахарозы на содержание лактата в зубном налёте

Актуальность

Содержание лактата в зубном налёте является одним из показателей, используемых для качественной оценки возможности формирования кариесогенной ситуации в полости рта. Микрофлора зубного налёта избирательно поглощает сахарозу пищевых продуктов и гидролизует её на глюкозу и фруктозу. Анаэробная микрофлора зубного налёта утилизирует полученные моносахариды по пути гликолиза с образованием лактата. Лактат снижает рН слюны

и зубного налёта, что нарушает в зубной эмали баланс между минерализацией и деминерализацией в пользу последней. Кариесогенности зубного налёта способствуют: наличие анаэробных микроорганизмов, повышенное употребление углеводов, высокая скорость образования бляшек.

Цель работы

Подтвердить, что употребление сладостей (лёгких углеводов) в перерывах между лекциями, на занятиях небезопасно для нормального состояния зубов.

Принцип метода

Определение уровня лактата основано на реакции Уффельмана. В которой фенолят железа фиолетового цвета преобразуется в лактат железа жёлтого цвета (интенсивность окраски от слабо жёлтой до ярко жёлтой отмечают: +, ++, +++).

Реактивы

1) 1% раствор фенола, 2) 1% раствор FeCl_3 , 3) 1% раствор лактата.
Леденцы или сахар-рафинад, жевательная резинка («Орбит» или другая).

Материал для исследования

Зубной налёт (для получения хорошего результата испытуемым студентам необходимо не чистить зубы утром в день занятия и накануне вечером, почистить зубы рекомендуется по окончании лабораторной работы).

Проведение анализа

1) У 2-х студентов тщательно снимают зубной налёт со щёчной поверхности маляров (слева или справа) ватным тампоном на палочке, тампоны помещают в пробирки (№1 и №2) с 0,5 мл дистиллированной воды. В пробирку №3 с 0,5 мл дистиллированной воды помещают 1 каплю раствора лактата (контроль реакции).

Цветная реакция на лактат. В отдельной пробирке из 2,0 мл раствора фенола и 3 капель раствора FeCl_3 готовят раствор фенолята железа фиолетового цвета. Смесь добавляют по 0,6 мл в пробирки №1, №2, №3, оценивают развитие окраски. При отсутствии лактата жидкость обесцвечивается, при его наличии появляется зеленовато-жёлтая окраска лактата железа.

2) Студент, имеющий слабо выраженное изменение окраски (+) пробы на лактат, употребляет леденцы или сахар-рафинад (медленно рассасывая). Через 15-20 минут проводят повторное получение зубного налёта (с противоположной стороны) и оценивают наличие лактата. Студент с более ярко выраженной окраской (++ или +++) пробы на лактат 10-15 минут использует жевательную резинку («орбит» или другую, имеющую в составе сахарозаменители сорбит, аспартам и другие компоненты, не содержащие сахарозу), затем аналогичным образом употребляет конфеты или сахар. Через 15-20 минут проводят повторное получение зубного налёта (с противоположной стороны) и определение в нём лактата.

Наглядность результатов работы

Увеличение образования лактата в зубном налёте после употребления конфет: фиолетовая окраска исходного раствора фенолята железа в реакции Уффельмана сменилась на выраженную жёлтую после добавления раствора, содержащего повторно снятый зубной налёт.

Снижение образования лактата в зубном налёте после жевания резинки «Орбит» или другой резинки: выраженное зеленовато-жёлтое окрашивание не появилось, фиолетовая окраска частично сохранилась или обесцветилась.

Практическое значение

Результаты подтверждают обоснованность мероприятий, рекомендуемых для профилактики кариеса: механическая очистка зубов и полости рта; повышение потребления овощей, фруктов; снижение потребления сладкого и отказ от него между приемами пищи и перед сном; уменьшение потребления продуктов с кислотами (соленья, маринады); использование вспомогательных антикариозных средств (жевательные резинки, жидкости для полоскания рта).

Оформление работы

Указывают принцип метода, фиксируют результаты, делают выводы по 1 и 2 испытуемым.

Лабораторная работа 6

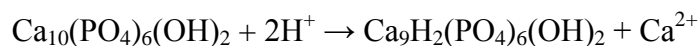
Определение влияния рН среды на состояние тканей зуба

Актуальность

Кислоты способны вымывать ионы кальция из тканей зуба, провоцируя сначала обеднение кристаллов гидроксиапатита кальцием и затем постепенное их разрушение.

Принцип метода

В кислой среде ионы кальция Ca^{2+} замещаются на ионы H^+ :



В итоге кислотная нагрузка ведёт к разрушению/растворению кристаллов.

Реактивы

1) Кислые растворы (лактат с добавлением HCl) $\text{pH}=5$ и $\text{pH}=6$, 2) раствор с нейтральным значением $\text{pH}=7$, 3) слабощелочной раствор (карбонатный) $\text{pH}=8$, 4) реактивы для определения содержания кальция (лабораторная работа 2).

Материал для исследования

Зубы с целой эмалью человека/животного, пластинки срезов зуба, слюна.

Проведение анализа

Работа относится к категории учебно-исследовательских (УИРС).

I этап. В ряд пронумерованных флаконов помещают одинаковые пластинки срезов зуба. Затем во все флаконы добавляют по 5 мл соответствующей жидкости (в каждой жидкости необходимо заранее измерить значение pH с помощью pH -метра или индикаторной бумаги и содержание кальция (см. лабораторная работа 2)):

№1 – ротовая жидкость (под №1 может быть несколько флаконов для ротовой жидкости разных людей, отмеченных разными добавочными литерами: 1а, 1б, 1в и др.), №2 – H_2O дистиллированная, №3 – кислая среда с $\text{pH}=5$, №4 – слабокислая среда с $\text{pH}=6$, №5 – нейтральная среда с $\text{pH}=7$ (контроль), №6 – щелочная среда с $\text{pH}=8$, далее (по желанию студентов) – жидкости «Кока-кола», «Спрайт», «Фанта» и подобные им.

II этап. Через 1 ч образцы достают из флаконов, отмывают, оценивают состояние, сравнивая с контрольным образцом. Во всех растворах измеряют pH , проводят анализ на содержание Ca . Снова помещают образцы во флаконы, оставляют на холоде до следующего занятия.

III этап. Окончательную оценку результатов проводят на следующем занятии. Достают и отмывают образцы зубов, регистрируют их состояние, сравнивая с контрольным образцом. В каждом растворе снова измеряют значение pH и анализируют содержание Ca (лаб. работа 2).

Оформление работы

Фиксируют результаты в виде таблицы, сравнивают их, делают вывод о наличии отклонений.

Исследуемые показатели		Слюна	H_2O дист	$\text{pH}=5$	$\text{pH}=6$	$\text{pH}=7$	$\text{pH}=8$	Кока-кола, Спрайт, Фанта или т.п.		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
I	pH									
	Ca									
		Е								
		С								
II	pH									
	Ca									
		Е								
		С								
III	pH									
	Ca									
		Е								
		С								

Е – экстинкция пробы, С – концентрация кальция, найденная по формуле (лаб. работа 2).

Самостоятельная работа

1. Ознакомиться с серией ИФА-тест-систем, используемых для оценки заболеваний, связанных с нарушениями обмена в костных тканях.
2. Усвоить комплексность подхода, применяемого в лабораторной диагностике нарушений обмена в костных тканях.
3. Сформировать представление о широте диапазона показателей, влияющих на минерализацию и общее состояние костной ткани.

Актуальность.

Биохимические показатели метаболизма костной ткани подразделяют на маркёры резорбции и маркёры образования. Процессы обмена в костной ткани обычно характеризуют с помощью ряда показателей, определяемых в плазме крови: 1) *маркёры образования кости*: содержание остеокальцина, проколлагеновых С- и N-пропептидов, активность специфической костной щелочной фосфатазы; 2) *маркёры резорбции кости*: содержание пиридинолина, дезоксипиридинолина, N- и С-телопептидов (продуктов деградации коллагена-I), активность тартрат-резистентной кислой фосфатазы. В моче также определяют продукты распада кости: кроме уровня N- и С-телопептидов коллагена-I, дезоксипиридинолина и пиридинолина, здесь оценивают количество Са, гидроксипролина, гликозидов гидроксизина.

На основе ИФА разработаны серии тест-наборов, которые могут быть использованы в диагностике состояния соединительной и костной тканей. В таблице приведён перечень ИФА-тест-систем, применяемых в мировой практике для анализа маркёров обмена костной ткани при диагностике нарушений и мониторинге терапии “остеотропных” заболеваний, с указанием названий ведущих мировых фирм-производителей.

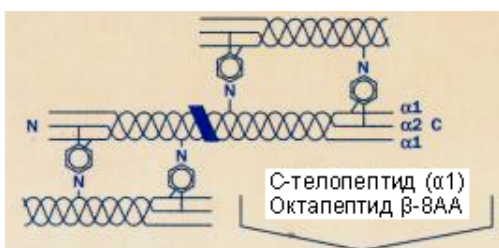
Фирма-производитель	Наименование ИФА-набора, количество определений
Nordic Bioscience Diagnostics	CrossLaps (определение в моче С-концевых телопептидов, образующихся при деградации коллагена I типа), 96
	Serum CrossLaps One Step (определение в сыворотке крови С-концевых телопептидов, образующихся при деградации коллагена I типа), 96
	N-MID Остеокальцин, 96
BCM Diagnostics	Костный изофермент щелочной фосфатазы (BAP), 96
DSL	Паратиреоидный гормон, 96
	Кальцитонин человека, 96
	Кальцитонин лосося, 96
	Рецептор 1,25(OH) ₂ витамина D ₃
IDS	25(OH)витамин D, 96
	1,25(OH) ₂ витамин D ₃
Biomedica	Остеопротегерин, 96
	RANKL, 96
	Катепсин, 96
Peninsula	Остеогенный пептид роста, 96

Диагностическое значение ИФА-систем,

рекомендуемых для оценки маркёров метаболизма костной ткани

При разрушении матрикса кости, дентина и цемента зуба коллаген I типа расщепляется, его небольшие фрагменты и специфические аминокислоты поступают в кровяное русло, выводятся с мочой. Анализ продуктов деградации позволяет оценить скорость резорбции кости.

С-телопептиды. С-телопептидные фрагменты – наиболее высокоспецифичные маркёры. Отщепление С-телопептида происходит на начальном этапе деградации коллагена-I, поэтому другие метаболиты коллагена практически не влияют на его концентрацию в плазме крови. Продукты расщепления С-телопептида коллагена состоят из 2 октапептидов, связанных поперечной сшивкой и находящихся в β-форме (структуры называют β-Crosslaps). Они попадают в кровь, где их количество оценивают методом ИФА. Здесь учитывается, что во



вновь сформированной кости концевые линейные последовательности октапептидов содержат α -аспарагиновую кислоту, но по мере старения кости α -аспарагиновая кислота изомеризуется в β -форму. Моноклональные антитела специфически распознают линейные октапептиды, содержащие именно β -аспарагиновую кислоту.



Принцип определения количества С-телопептида системой «Elecsys β -crosslaps/Serum»

Одновременно с С-телопептидами в плазме крови появляется кислая фосфатаза.

Тартрат-резистентная кислая фосфатаза (TRACP 5B) секретируется остеокластами, попадает в повышенном количестве в кровотоки при увеличении количества остеокластов и возрастании их активности. Тест-система фирмы БиоХимМак позволяет определять только активные формы TRACP-молекул, секретируемые во внеклеточное пространство кости, и не детектирует старые, инактивированные молекулы TRACP или их фрагменты, которые могли появиться во время сбора образца крови.

Костный изофермент щелочной фосфатазы (ВАР) представляет собой тетрамерный гликопротеин, обнаруживаемый на клеточной поверхности остеобластов. Количественная оценка ВАР, как маркера метаболизма кости, дает полезную информацию о костном ремоделировании и влиянии антирезорбционной терапии на активность заболевания.

Остеокальцин. Активные остеобласты продуцируют специфический маркер ремоделирования кости – gla-белок остеокальцин, содержащий γ -карбоксиглутаминовую кислоту, за счёт чего прочно связывается с Ca^{2+} гидроксиапатитов в костях и зубах. Попадая в кровь, остеокальцин быстро расщепляется на несколько фрагментов разной длины, их обнаруживают методом ИФА. Диагностикум создан на основе двух высокоспецифичных моноклональных антител, одно из которых «узнаёт» среднюю часть полипептида (N-MID фрагмент), другое – N-концевой участок остеокальцина. Концентрация обоих фрагментов измеряется по хемилюминесценции (ХЛ) рутения, которым мечены антитела.



Принцип определения остеокальцина тест-системой «Elecsys N-MID osteocalcin test»

Тест-системы Остеокальцин и CrossLaps рекомендованы международным фондом изучения остеопороза как маркеры мониторинга антирезорбционной терапии. Маркёры резорбции кости определяют до начала терапии и через 3-6 мес. Маркёры образования кости – до терапии и 6 мес спустя. При неоднозначных изменениях маркёры измеряют 3-й раз через 3 мес.

Гомеостаз кальция в организме обеспечивает гормональная система «паратгормон-кальцитриолы-кальцитонин», её основная функция – регуляция движения Ca^{2+} и фосфатов в организме, поддержание постоянства уровня Ca^{2+} в крови. Эти гормоны контролируют процесс резорбции кости: паратгормон и $(1,25(\text{OH})_2\text{D}_3)$ его усиливают, а кальцитонин и $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ его тормозят.

1. **Паратиреоидный гормон (ПТГ)** синтезируют паратиреоидные железы в ответ на уменьшение внеклеточной концентрации Са. ПТГ приводит к поступлению в кровь кальция и фосфатов за счёт стимуляции остеокластов и резорбции кости, к повышению всасывания Са в кишечнике и реабсорбции Са в канальцах почек – вследствие активации образования кальцитриола. Наиболее распространены методы ИФА, основанные на выявлении С-концевого или средних фрагментов гормона. При недостаточности почек С-концевые фрагменты ПТГ накапливаются в крови, и определяемый уровень гормона оказывается искусственно завышен. Поэтому разработана диагностически более значимая тест-система на основе двух высокоспецифичных поликлональных антител, каждое из них реагирует с эпитопами именно N-терминальной части интактного ПТГ.

2. **Витамин D-зависимые маркеры.**

25(OH)-витамин D является главным циркулирующим метаболитом витамина D, рецепторы к нему представлены в мышечной ткани. Несмотря на то, что биологически наиболее активен витамин в форме синтезируемого в почках $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, методом диагностики и контроля лечения гиповитаминоза D и ассоциированных заболеваний признана оценка циркулирующего $25(\text{OH})\text{D}_3$.

1,25(OH)₂витамин D₃ (кальцитриол) – прямой антирахитический фактор, повышает уровень Са в крови, по механизму действия подобен стероидным гормонам. Измерение содержания $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ не очень выгодно для оценки общего статуса витамина D, его используют только с целью дифференциальной диагностики заболеваний и оценки эффективности $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -терапии.

Рецептор 1,25(OH)₂витамина D₃. Кальцитриол действует через специфические рецепторы к витамину D. Главными органами-мишенями выступают кости, кишечник, почки, также рецепторы обнаружены, по меньшей мере, в 35 органах и тканях. Иногда важно определять именно концентрацию рецептора витамина D, поскольку прогрессирование костной патологии может быть связано с развитием устойчивости к витамину D (дефицитом рецепторов витамина D).

3. **Кальцитонин человека.** Синтезируется и секретируется парафолликулярными С-клетками щитовидной железы. Основное действие - снижение уровня Са в плазме через ингибирование активности остеокластов, приводящее к снижению выхода Са из кости. Секретию его стимулирует рост концентрации Са в плазме, регулируют желудочно-кишечные пептиды, эстрогены, витамин D.

Кальцитонин лосося (Salmon Calcitonin) часто используют с целью подавления костной резорбции при лечении остеопороза, когда важно поддерживать его концентрацию на терапевтически определённом уровне, для чего проводят мониторинг препарата в крови ИФА-тест-системами.

Остеопротегерин (OPG) и **RANKL** (Receptor activator of NF- κ B ligand – лиганд рецептора активатора ядерного фактора каппа В) играют ключевую роль в регуляции ремоделирования костной ткани. Остеобласты определяют развитие, дифференцировку, функционирование остеокластов и продуцируют фактор дифференцировки остеокластов – RANKL. Предшественники остеокластов в ходе межклеточного взаимодействия с остеобластами узнают фактор RANKL и воспринимают его как сигнал к началу дифференцировки в остео-

класты. Рост экспрессии RANKL приводит к резорбции костной ткани и ингибированию апоптоза остеокластов.

Экспрессию мРНК RANKL повышают паратгормон, витамин D, интерлейкины 1 и 11, простагландин E₂. Остеопротегерин – растворимый гликопротеин из семейства рецепторов факторов некроза опухоли, секретируется клетками стромы, в том числе остеобластами. Это ключевой ингибитор дифференцировки остеокластов (подавляет конечную стадию процесса), индуцирует их апоптоз. OPG, являясь «ловушкой» рецепторов, конкурентно ингибирует связывание RANKL с рецептором RANK, чем ингибирует мобилизацию, пролиферацию и активацию остеокластов. OPG повышает массу кости, снижает гиперкальциемию, предупреждает кальцификацию больших артерий. Баланс между продукцией RANKL и OPG во многом определяет характер ремоделирования кости. Система RANKL/RANK/OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов.

Катепсин. Фермент деградации белков, активируется при резорбции матрикса кости.

Остеогенный пептид роста. Небольшой регуляторный пептид, вырабатываемый в костной ткани, нужен для правильного моделирования и ремоделирования кости.

Задания для самоконтроля

1. В таблице укажите процентное содержание веществ в костной и зубных тканях.

Ткани	Минеральные вещества	Кальций и фосфаты	Органические вещества	Белок	Вода
Кость					
Эмаль					
Дентин					
Цемент					
Пульпа					

2. Укажите влияние концентрации ионов кальция в крови на синтез/секрецию гормонально активных веществ, регулирующих кальций-фосфорный обмен. Обозначьте повышение синтеза/секреции – ↑, снижение – ↓.

Уровень Ca ²⁺	Синтез кальцитриола (1,25(OH) ₂ D ₃)	Секреция паратирина	Секреция кальцитонина
Повышен			
Снижен			

3. Подберите пары, состоящие из формулы фосфатной соли кальция и соответствующего ей названия.

Формула	Название
1. CaHPO ₄ •2H ₂ O	А. Гидроксиапатит
2. Ca ₈ (HPO ₄) ₂ (PO ₄) ₄ •5H ₂ O	Б. Фторапатит
3. Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	В. Магниевый апатит
4. Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ F ₂	Г. Брушит
5. Ca ₁₀ (PO ₄) ₅ (HCO ₃)(OH) ₂	Д. Карбонатный апатит
6. Ca ₉ Mg(PO ₄) ₆ (OH) ₂	Е. Октакальций фосфат

Вопросы для самоконтроля

1. Строение, органический и минеральный состав и функции костной ткани и твёрдых тканей зуба. Сходство и различие твердых тканей.
2. Органические соединения кости, особенности белков и углеводов. Ферменты, цитрат, пирофосфат, фосфолипиды в построении и минерализации кости.

3. Особенности химического состава эмали, молекулярно-функциональная модель структуры эмали. Белки эмбриональной и зрелой эмали, их роль в минерализации. Пути поступления веществ в эмаль зуба.
4. Химический состав и функции дентина и цемента, виды и особенности дентина, цемента. Специфические белки. Минерализация разных видов дентина.
5. Характеристика и основные показатели минерального обмена. Макроэлементы Ca, P Mg, свойства кальциевых солей фосфорной кислоты. Обмен кальция и фосфатов, роль в обмене зуба и кости. Внутри- и внеклеточный кальций, участие в метаболизме и регуляции. Ca-связывающие белки.
6. Теории минерализации кости и зуба. Механизмы минерализации кости, роль органических и минеральных компонентов, источники энергии. Витамины, гормоны, белковые и небелковые факторы в регуляции обмена кости и зуба.
7. Ремоделирование кости, специфика альвеолярного отростка. Метаболические особенности и регуляция активности остеокластов и остеобластов.
8. Фтор, стронций и другие микроэлементы, роль в процессах жизнедеятельности. Влияние на апатиты, кость и ткани зуба. Гипофтороз, флюороз зубов.
9. Поверхностные образования на зубах, образование и состав. Простые сахара, гликолиз и «метаболический взрыв» анаэробной микрофлоры, углеводно-фосфорный обмен, судьба лактата, муреин и синтез стромы зубного налета. Минералы и минерализация бляшки. Биохимия кариеса.

Тестовые задания

Выбрать один правильный ответ.

1. ОСНОВНОЙ СТРУКТУРНОЙ ЕДИНИЦЕЙ МОЛЕКУЛЫ КОЛЛАГЕНА I ТИПА ЯВЛЯЕТСЯ
 - 1) триада (ГЛИ-ПРО-Х)
 - 2) триада (ПРО-ГЛИ-ЛИЗ)
 - 3) комплекс (ПРО-гидроксиПРО)
 - 4) комплекс пиридинолина
 - 5) комплекс пирролидина

2. СПЕЦИФИЧНОСТЬ КОЛЛАГЕНАЗЫ ПРОЯВЛЯЕТСЯ В ГИДРОЛИЗЕ ПЕПТИДНЫХ СВЯЗЕЙ
 - 1) между ГЛИ-ЛЕЙ в каждой из 3-х цепей по всей длине коллагена
 - 2) между ГЛИ-ЛИЗ в 3-х местах по длине молекулы коллагена
 - 3) между ГЛИ-гидроксиПРО на 1/3 от С-конца молекулы коллагена
 - 4) сразу 3 цепей в середине коллагена-I, с разрывом пополам
 - 5) между ГЛИ-гидроксиЛИЗ на 1/3 от N-конца молекулы коллагена

3. МОЛЕКУЛЫ ЭЛАСТИНА СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ СТАБИЛИЗИРОВАНЫ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫМИ КОВАЛЕНТНЫМИ СШИВКАМИ
 - 1) пиридинолина
 - 2) норлейцина
 - 3) изодесмозина
 - 4) гидроксипиррола
 - 5) гидроксипиридинолина

4. К КЛАССУ ГИАЛЕКТАНОВ – БОЛЬШИХ ПРОТЕОГЛИКАНОВ МЕЖКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ОТНОСИТСЯ
 - 1) синдекан
 - 2) агрин

- 3) кератокан
- 4) агрекан
- 5) декорин

5. У ЛЮДЕЙ С ПОВРЕЖДЕННЫМИ ПОЧКАМИ ПРИЧИНОЙ РАЗВИТИЯ РАХИТОПОДОБНОГО ПРОЦЕССА С ДЕМИНЕРАЛИЗАЦИЕЙ КОСТЕЙ НА ФОНЕ СБАЛАНСИРОВАННОЙ ДИЕТЫ ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) потеря кальциферол-переносящего белка
- 2) нарушения образования 1,25-дигидроксикальциферола
- 3) нарушения образования 25-гидроксиколекальциферола
- 4) нарушения всасывания витамина D

6. В МОДЕЛИРОВАНИИ КОСТИ АКТИВНОЕ УЧАСТИЕ ПРИНИМАЕТ

- 1) лактатдегидрогеназа
- 2) щелочная фосфатаза
- 3) кислая фосфатаза
- 4) пируваткарбоксилаза
- 5) аминотрансфераза

7. БЕЛОК, СТИМУЛИРУЮЩИЙ РОСТ ДЕНТИНА, ОТНОСЯТ К

- 1) морфогенам
- 2) митогенам
- 3) трансформирующим факторам
- 4) факторам хемотаксиса
- 5) факторам хемоаттракции

8. ПО МЕХАНИЗМУ ГОМОГЕННОЙ НУКЛЕАЦИИ МИНЕРАЛИЗУЕТСЯ ДЕНТИН

- 1) вторичный
- 2) третичный
- 3) перитубулярный
- 4) интертубулярный
- 5) плащевой

9. В ОРГАНИЧЕСКОЙ МАТРИЦЕ ЗРЕЛОЙ ЭМАЛИ СТРУКТУРНОЙ РОЛИ НЕТ У

- 1) Са-связывающих белков
- 2) фосфолипидов
- 3) белков, нерастворимых в ЭДТА и соляной кислоте
- 4) водорастворимых белков

10. ПРИ РАННЕМ КАРИЕСЕ ГЛАВНЫМ УСЛОВИЕМ ОБРАТИМОСТИ ДЕМИНЕРАЛИЗАЦИИ ЭМАЛИ ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) связывание ионов кальция, фосфатов со свободными ГЛУ и ЛИЗ
- 2) сохранение структуры белковой матрицы эмали
- 3) выравнивание соотношения Са/Р в слюне до 1
- 4) доставка максимального количества F для укрепления эмали
- 5) препятствие потере критических 10 % Са кристаллами апатитов

Ситуационные задачи

Ответы подробно пояснить.

1. При медицинском обследовании подростка, обратившегося к врачу с жалобами на остановку роста костей, было выявлено, что пациент плохо видит в темноте на фоне развития

поражений глазного яблока в виде ксерофтальмии, имеет признаки гастрита, колита и цистита. Указать, с недостаточностью какого витамина это связано, и какова роль данного витамина в процессах минерализации и возникновении симптомов развившихся заболеваний.

2. У пациента на рентгенограммах выявлена деструкция костной ткани, в плазме крови повышено содержание ионизированного кальция, в моче – содержание фосфатов. Назвать возможную причину наблюдаемых явлений. Пояснить, какие основные минеральные компоненты участвуют в построении костной ткани, какие гормоны регулируют фосфорно-кальциевый обмен, избыток какого гормона приводит к данным изменениям. Указать, активность какого фермента будет повышена в костной ткани при её разрушении.

3. У ребенка отмечается изъеденность эмали и коричневые пятна на зубах. В эмали обнаружено высокое содержание фтора, белка и пониженное содержание кальция. Указать, для какого заболевания характерна такая картина. Назвать основные белки эмали, сколько белка содержится в здоровой эмали ребенка и у взрослого человека. Пояснить, какова концентрация фтора в питьевой воде в норме, роль фтора в составе эмали.

4. Анализ мочи у больного, госпитализированного в стационар по поводу тяжелой болезни сердца и длительное время находящегося в постели в неподвижном состоянии, показал нарастание содержания солей кальция. Пояснить, связано ли это с основной болезнью или с какой-либо другой причиной.

ТЕМА

СОЕДИНИТЕЛЬНАЯ, КОСТНАЯ И ЗУБНЫЕ ТКАНИ (КОНТРОЛЬНОЕ ЗАНЯТИЕ ПО РАЗДЕЛУ 10)

Вопросы для самоподготовки

Соединительная ткань

1. Структура соединительной ткани, роль в организме. Характеристика межклеточного органического матрикса. Этапы синтеза, ферменты деградации.
2. Коллаген, характеристика типов и групп коллагена. Основные этапы синтеза коллагена и механизм формирования коллагенового волокна. Строение коллагенового волокна. Нарушения синтеза коллагена.
3. Неколлагеновые белки соединительной ткани: эластин, фибронектин, ламинин. Особенности строения и функции.
4. Классификация и характеристика протеогликанов. Протеогликаны матрикса, клеточной и базальной мембран. Специфика углеводного компонента.
5. Регуляция метаболизма соединительной ткани. Нарушения образования соединительной ткани. Металлопротеиназы, гиалуронидаза и другие ферменты деградации матрикса. Болезни соединительной ткани.
6. Пульпа зуба как вариант специализированной соединительной ткани: состав, функции. Особенности фибробластов и клеток защиты (макрофаги, лимфоциты, антигенпредставляющие и тучные клетки) пульпы, их взаимодействие. Биохимические изменения в депульпированном зубе.

Минерализованные ткани и минерализация

7. Костная ткань как частный случай соединительной ткани. Строение, характеристика, роль минералов и органического компонента кости. Белки кости: особенности строения, роль. Формирование органической матрицы кости.
8. Функции остеобластов, остеоцитов, остеокластов в процессах обмена кости. Минерализация и деминерализация органической матрицы кости, механизмы, участие ферментов, вклад кальция, фосфора и минорных минералов.

9. Регуляция остеогенеза и обмена костной ткани: роль витаминов, гормонов, белков, неорганических компонентов. Нарушение структуры кости – остеомалация, остеопороз, рахит: причины, диагностика, профилактика, лечение.
10. Цемент: виды, роль, органические вещества, минералы, особые белки. Различия и сходство с костью, дентином, участие в регенерации. Гиперцементоз.
11. Дентин и одонтобласты. Виды дентина, происхождение, функции и химический состав. Предентин, особенности органического матрикса и минерализации интертубулярного и плащевого дентина, вторичный и третичный дентин. Изменения при кариесе, дентинные каналы. Дентинная жидкость: химический состав, происхождение, значение. Эмалево-дентинный барьер.
12. Эмаль: происхождение, функции, неорганический состав, кристаллы, структурные единицы, водная фаза. Синтез, состав эмбриональной эмали, созревание, минерализация, проницаемость и растворимость. Структура и функции зрелой эмали, уникальность в сравнении с костью, дентином.
13. Обмен кальция и фосфора. Роль кальция, фосфора, магния, карбонатов и микроэлементов в формировании структуры кости и тканей зуба, при деминерализации и реминерализации эмали.
14. Значение коллагена и неколлагеновых белков кости и тканей зуба в накоплении Са и минерализации, первичные кристаллы. Участие фосфолипидов, цитрата, полифосфатов в минерализации. Роль щелочной фосфатазы.
15. Теории минерализации кости и твёрдых тканей зуба. Гомогенная и гетерогенная нуклеация. Роль клеток в накоплении минералов, минерализации, матриксные пузырьки. Факторы различной природы, влияющие на процессы кристаллизации. Типы кристаллов.
16. Минеральная фаза твёрдых тканей: разнообразие компонентов (формулы), состав аморфной фазы и этапы её преобразования в гидроксиапатит. Сравнение кристаллов гидроксиапатита кости и тканей зуба. Механизм формирования кристаллов гидроксиапатита в эмали.
17. Условия образования вакансий, этапы изоморфного замещения элементов кристаллической решетки, роль в модификации кристаллов апатита. Реакции включения макро- и микроэлементов в кристаллы гидроксиапатита, последствия для кости и тканей зуба. Рахитоподобные состояния, «уровская болезнь» (Кашина-Бека), другие патологии.
18. Источники фтора, потребность, обмен, роль в организме, влияние на ткани зуба. Недостаток и избыток фтора в организме, гипофтороз, флюороз зубов.
19. Поверхностные образования на зубах. Кутикула, пелликула – происхождение и состав, механизмы участия белков слюны в образовании пелликулы. Образование зубного налёта, бляшки, камня – причины образования и состав, роль микрофлоры в синтезе органического компонента, особенности минерализации, разнообразие минералов.
20. Кариесогенные факторы и кариесорезистентность. Значение микрофлоры и углеводов в возникновении кариеса, механизмы его развития и биохимические нарушения в разных тканях зуба, профилактика.
21. Влияние питания на состояние зубов. Роль углеводов, белков, витаминов и микроэлементов.

Практическая часть

1. Определение количества гексоз гликопротеинов в сыворотке крови.
2. Определение содержания общего кальция и фосфатов в сыворотке крови.
3. Определение наличия белков и минеральных компонентов ткани зуба.
4. Определение активности щелочной фосфатазы в слюне.
5. Изучение проницаемости эмали зуба.
6. Влияние рН среды на состояние тканей зуба.
7. Влияние сахарозы на содержание лактата в зубном налёте.
8. Определение концентрации фторидов в питьевой воде.

РАЗДЕЛ II

КРОВЬ. МОЧА

ТЕМА 11.1

БЕЛКИ, ФЕРМЕНТЫ, АЗОТСОДЕРЖАЩИЕ ВЕЩЕСТВА КРОВИ

Актуальность

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

Цель

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

Вопросы для самоподготовки

1. Органические и неорганические компоненты крови. Форменные элементы, плазма, сыворотка крови. Источники глюкозы, триацилглицеролов, холестерина и его фракций в крови. Клинко-диагностическое значение определения их содержания в крови.
2. Азотсодержащие вещества крови. Понятие общего белка крови. Определение концентрации общего белка в сыворотке крови, нормальные показатели и клинко-диагностическое значение. Причины гипо- и гиперпротеинемий.
3. Свойства белков крови, физиологические функции. Пробы на коллоидоустойчивость белков крови. Принцип тимоловой пробы и пробы Вельтмана. Нормальные показатели и клинко-диагностическое значение.
4. Основные белковые фракции сыворотки крови, нормальные величины. Примеры белков каждой фракции (см. Приложение).
5. Диспротеинемии, парапротеинемии. Возрастная динамика белковых фракций. Эмбриоспецифические белки, их диагностическое значение.
6. Понятие протеинограммы, клинко-диагностическое значение определения белковых фракций. Принцип электрофореза. Изменение соотношения белковых фракций при остром и хроническом воспалении, патологиях печени, почек, опухолевых заболеваниях.
7. Основные ферменты плазмы и сыворотки крови. Понятие энзимодиагностики, примеры. Истинно плазменные (плазмоспецифичные) ферменты. Группы органоспецифичных ферментов: индикаторные (клеточного метаболизма), экскреторные (секретируемые) ферменты. Примеры, возможности использования в диагностике заболеваний.
8. Остаточный азот крови, компоненты и их количественный состав. Причины и виды гиперазотемий. Определение общего количества остаточного азота в сыворотке крови. Нормальные показатели и клинко-диагностическое значение. Значение определения отдельных фракций остаточного азота.
9. Гипераммониемии, их причины и последствия. Нормальный и предельно допустимый уровни концентрации аммиака в крови. Причины токсичности аммиака, влияние на нервную ткань и энергетический обмен.
10. Синтез креатина и креатинина, нормальные величины концентрации в крови. Клинко-диагностическое значение оценки креатина и креатинина в крови и моче. Клиренс.

11. Синтез мочевины. Нормальные величины ее концентрации в крови. Клинико-диагностическое значение определения концентрации мочевины в крови и моче.
12. Синтез мочевой кислоты. Нормальные величины концентрации в крови. Клинико-диагностическое значение определения концентрации мочевой кислоты в крови и моче.

Самостоятельная работа

Заполнить таблицу представителей основных глобулиновых фракций плазмы крови с указанием их функций. Использовать за основу Приложение 5.

α_1 -глобулины		α_2 -глобулины		β -глобулины		γ -глобулины	
Белок	Функции	Белок	Функции	Белок	Функции	Белок	Функции

Темы для реферативных сообщений

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

Лабораторная работа 1

Определение содержания остаточного азота в сыворотке крови

Актуальность

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

Принцип метода

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

Реактивы

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

Материал для исследования

Сыворотка крови.

Проведение анализа

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

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

	Опыт, мл	Стандарт, мл
Минерализат Стандартный раствор (NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 —	— 1,0
Раствор NaOH	добавляют по каплям, проверяя величину рН по лакмусовой бумажке, пока рН не станет нейтральной и лакмус не посинеет (излишек NaOH вызывает помутнение раствора)	
Дистил. вода Реактив Несслера	8,0 2,0	8,0 2,0
	Измеряют оптическую плотность опыта и стандарта против воды в кювете с длиной оптического пути 10 мм при длине волны 540 нм (зеленый светофильтр)	

Расчет

Расчёт проводят по формуле:

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

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

Клинико-диагностическое значение

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

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

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

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

Оформление работы

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

Лабораторная работа 2 (теоретически)

Электрофорез белков на бумаге и ацетатцеллюлозных пленках

Принцип

Белковые молекулы, отрицательно заряженные при рН 6,8, перемещаются в электрическом поле постоянного тока по направлению к аноду. Наиболее быстро перемещаются альбумины, затем по порядку α_1 -, α_2 -, β - и γ -глобулины. На ход электрофореза влияет подвижность разделяемых веществ, зависящая от следующих факторов: 1) заряд (зависит от рН), размеры и форма молекул веществ; 2) электрическое поле – скорость движения ионов белка прямо пропорциональна силе тока и напряжению и обратно пропорциональна сопротивлению (зависит от типа и размеров носителя и ионной силы буфера); 3) буферный раствор – состав, концен-

трация, рН и ионная сила (зависит от концентрации присутствующих ионов и их заряда);
4) носитель – учитывается его гидрофильность и адсорбция веществ на его молекулах.

Материал для исследования

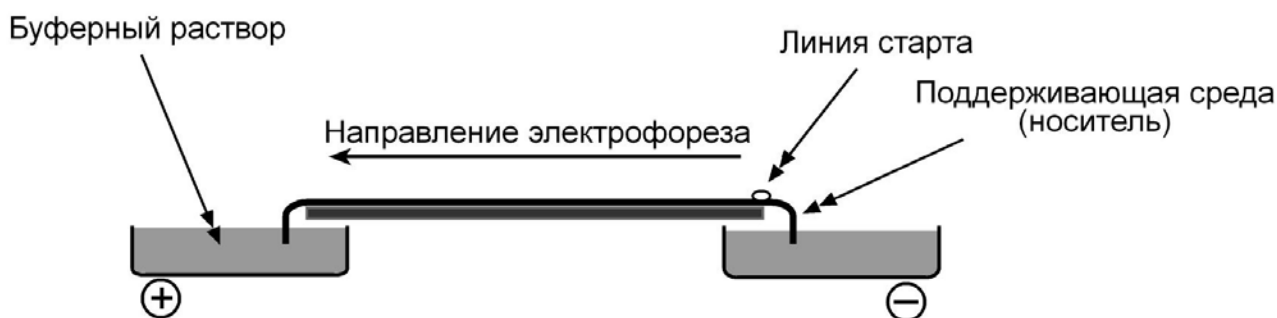
Сыворотка крови.

Оборудование

1) Прибор для электрофореза, 2) денситометр.

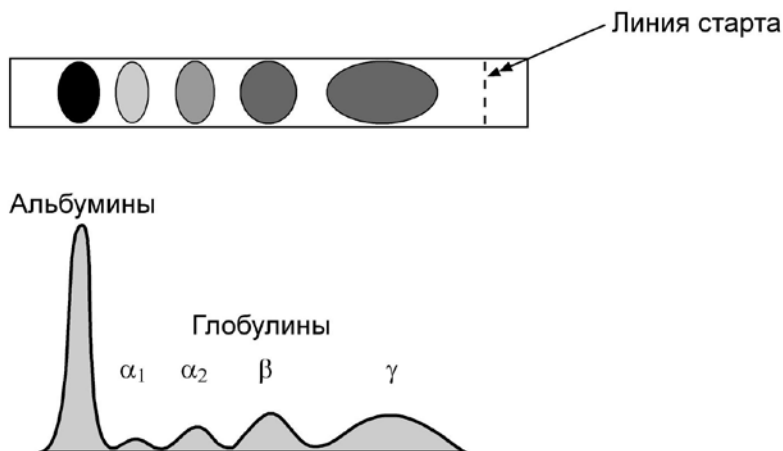
Проведение анализа (основные положения)

Образцы сыворотки равномерно наносят по линии старта на носитель (бумага, ацетатцеллюлозная пленка). Носитель помещают в прибор для электрофореза, подают электрический ток. Буферный раствор, двигаясь в электрическом поле, захватывает молекулы белка. Молекулы с наибольшим отрицательным зарядом и наименьшим размером (альбумины) двигаются быстрее остальных, последними оказываются наиболее крупные и нейтральные (γ -глобулины). Через определенное время (устанавливают для каждого прибора индивидуально) электрофорез завершают.



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

Фракции белков сыворотки крови на электрофореграмме



Клинико-диагностическое значение

Альбумины

Снижение содержания фракции альбуминов связано с пониженным синтезом альбуминов – при врожденной анальбуминемии, белковом голодании, нарушении всасывания при пищева-

рении, тяжелых поражениях печени (цирроз, дистрофии, некроз, активный гепатит, амилоидоз печени); или с повышенным катаболизмом альбуминов – при лихорадке, кахексии, тяжелых инфекциях, панкреатите, коллагенозах, тиреотоксикозе, болезни Иценко-Кушинга (гипофункция надпочечников); или с потерей альбуминов через почки, поверхности ожогов, пищеварительный тракт; или с выходом альбумина из кровотока в межклеточное пространство при воспалительных процессах.

α-Глобулины

Повышение содержания α₁- и α₂-глобулиновой фракции происходит при острых и подострых воспалительных процессах, некоторыми злокачественными опухолями, травмах, так как эти фракции содержат большинство белков острой фазы (С-реактивный белок, церулоплазмин, гаптоглобин, α₁-гликопротеин, α₁-анти-трипсин, α₂-макроглобулин).

β-Глобулины

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

γ-Глобулины

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

Лабораторная работа 3 **Оценка альбуминовой фракции белков сыворотки крови**

Реактивы

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

Материал для исследования

Сыворотка крови.

ОЦЕНКА КОНЦЕНТРАЦИИ АЛЬБУМИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Принцип

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

Проведение анализа

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

	Опыт, мкл	Стандарт, мкл
Сыворотка крови	20	-
Стандартный альбумин	-	20
Рабочий раствор	2000	2000
	Перемешивают, инкубируют 1 мин, измеряют оптическую плотность опыта и стандарта против рабочего реактива при длине волны 628 (578-640) нм в кювете 5,0 мм	

Расчет

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

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

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

Нормальные величины

Сыворотка крови 30-50 г/л

БИУРЕТОВЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩЕГО БЕЛКА

Принцип

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

Проведение анализа

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

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

Расчет

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

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

Нормальные величины

Сыворотка крови 65–83 г/л

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

$$\text{Фракция альбуминов [\%]} = 100 \frac{A}{B},$$

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

Нормальные величины

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

Клинико-диагностическое значение

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

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

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

Гиперпротеинемия. Истинный рост содержания белка в крови чаще всего связан с увеличением фракции глобулинов при острых инфекциях (активный синтез белков острой фазы), хронических инфекциях (за счет γ -глобулинемии), миеломной болезни, лимфогрануломатозе, саркоидозе.

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

Гипопротеинемия часто связана с уменьшением фракции альбуминов крови. Истинная (абсолютная) гипопротеинемия: при недостаточном потреблении белка с пищей – заболевания желудочно-кишечного тракта, сужение пищевода, частичное/полное голодание; снижении синтеза белка – дисбаланс пищи по аминокислотам, хронические гепатиты, интоксикации, злокачественные опухоли, лечение кортикостероидами; усиленном распаде белка – кахексия, тяжелые инфекции, длительные воспалительные процессы, лихорадочные состояния, тиреотоксикозы; потере белка – нарушения проницаемости стенок капилляров, кровоизлияния, ожоги, острые и хронические кровотечения, нефротический синдром.

Относительная гипопротеинемия связана с нарушением водного баланса – гипергидратация при гиперальдостеронизме; со снижением экскреции солей – при почечной недостаточности, а также использовани для питья морской воды и неадекватных инфузиях солевых растворов.

Оформление работы

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

Лабораторная работа 4

Проведение проб на коллоидоустойчивость белков сыворотки крови

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

Материал для исследования

Сыворотка крови.

ТИМОЛОВАЯ ПРОБА

Принцип

Сывороточные β -, γ -глобулины, липопротеины осаждаются тимоловым реактивом при pH 7,55 при образовании глобулин-тимол-липидного комплекса.

Реактивы

1) Тимоловый буфер, pH 7,55-7,6, 2) шкала сравнения: калибровочные растворы с разной интенсивностью мутности (перед использованием их перемешивают)

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

Проведение анализа

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

Нормальные величины:

Сыворотка крови 0-4 ед.S-H

Практическое значение

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

ОСАДОЧНАЯ ПРОБА ВЕЛЬТМАНА В МОДИФИКАЦИИ ТАЙФЛЯ

Принцип

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

Реактивы

0,5 % CaCl_2 .

Проведение анализа

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

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

Нормальные величины

Сыворотка крови 0,4-0,5 мл раствора CaCl_2

Оформление работы

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

Вопросы для самоконтроля

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

3. Общая характеристика, происхождение и свойства ферментов плазмы крови. Органоспецифичные и собственно плазменные ферменты. Энзимодиагностика заболеваний. Ингибиторы протеиназ плазмы в лечении заболеваний
4. Понятие о формах поступления и выведения азота из организма. Образование, транспортные формы и утилизация аммиака в организме.
5. Остаточный азот и его фракции в сыворотке крови. Клиническое значение определения общего показателя остаточного азота и отдельных фракций (мочевина, мочевая кислота, креатин-креатинин и др.), клиренс креатинина.

ТЕМА 11.2

ЭРИТРОЦИТ. ОБМЕН ЖЕЛЕЗА И ГЕМОПРОТЕИНОВ

Актуальность

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

Цель

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

Вопросы для самоподготовки

1. Обмен железа в организме: потребность, всасывание, транспорт, железо-связывающие белки, запасная форма. Пищевые источники. Симптомы и клинические проявления недостаточности железа. Понятие гемохроматоза.
2. Функции эритроцитарных белков – спектрина, гликофорина, белка полосы 3. Особенности окисления глюкозы в эритроците. Механизмы защиты мембраны эритроцита от окисления.
3. Строение гема, реакции и основные этапы его синтеза. Регуляция синтеза гема и гемоглобина.
4. Причины порфирий, их клинические проявления, основы лечения порфирий. Талассемии, их виды и причины.
5. Строение наиболее распространённых в организме гемсодержащих белков (гемоглобин, миоглобин, цитохромы, каталаза, пероксидаза), их функции и локализация.
6. Патологические и физиологические типы гемоглобина (оксигенированный, гликозилированный, серповидно-клеточный гемоглобин; карбо-, карбокси- и метгемоглобин). Значение определения концентрации окси- и карбогемоглобина, гликозилированного гемоглобина.
7. Реакции, происходящие в эритроците в капиллярах легких и тканей (схемы).
8. Механизмы транспорта углекислого газа. Транспортные формы углекислого газа, связь CO_2 с гемоглобином, роль карбоангидразы. Роль эритроцита в изменении концентрации бикарбонат-ионов плазмы.
9. Механизм транспорта кислорода. Связывание гемоглобина с кислородом, нормальная степень насыщения гемоглобина кислородом, влияние температуры, величины рН, концентрации CO_2 на сродство гемоглобина к O_2 , регуляция. Кооперативность протомеров гемоглобина, эффект Бора, роль 2,3-дифосфоглицерата.

10. Кривые насыщения гемоглобина кислородом или диссоциации гемоглобина. Причины S-образного характера кривой диссоциации.
11. Распад гемоглобина и гема в ретикулоэндотелиальной системе.
12. Непрямой (свободный) билирубин, его строение, реакции образования. Дальнейшая судьба непрямого билирубина.
13. Прямой (связанный) билирубин, его строение, реакции образования, дальнейшая судьба. Роль фермента УДФ-глюкуронилтрансферазы. Выведение конечных продуктов распада гема.
14. Состояния, связанные с избыточным распадом гемоглобина. Причины гемолитической желтухи, её виды и лабораторные критерии.
15. Состояния, связанные с нарушениями оттока желчи. Причины обтурационной желтухи и её лабораторные критерии.
16. Состояния, связанные с недостаточностью функции гепатоцитов. Причины паренхиматозной желтухи и её лабораторные критерии.
17. Виды физиологической и патологической желтухи новорожденных.
18. Нарушения выведения билирубина – наследственные (синдромы Жильбера-Мейленграхта, Криглера-Найара, Дубина-Джонсона) и приобретенные (избыток эстрогенов молока, инфекционные и токсические причины). Представление о механической желтухе при муковисцидозе, болезни Нимана-Пика, гипоплазии желчных путей.

Темы для реферативных сообщений

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

Самостоятельная работа

Дополнить схему углеводно-энергетического обмена (см. темы 3.1, 4.1, 4.2), представив реакции синтеза 2,3-дифосфоглицерата, связанные с гликолизом.

Лабораторная работа 1

Определение концентрации гемоглобина в крови

Актуальность

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

Принцип

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

Реактивы

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

Материал исследования

Свежая кровь.

Проведение анализа

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

Расчет

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

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

Нормальные величины

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

Клинико-диагностическое значение

Снижение концентрации гемоглобина наблюдается при анемиях – железодефицитной (до 60 г/л), геморрагической, гипопластической, гемолитической, B_{12} -дефицитной. Увеличение концентрации гемоглобина наблюдается при миелопролиферативных заболеваниях – эритремии (до 210 г/л), симптоматических эритроцитозах – пролиферации элементов эритропоэза, при обезвоживании.

Оформление работы

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

Лабораторная работа 2

Определение концентрации общего билирубина и его фракций в сыворотке крови

Актуальность

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

Принцип

Сульфаниловая кислота с азотистым натрием дает диазофенилсульфовую кислоту, образующую с билирубином окрашенные азопигменты (диазореакция Эрлиха). Связанный (прямой) билирубин реагирует быстро, и о его концентрации судят по первоначальной интенсивности окраски. Несвязанный билирубин вступает в реакцию после добавления акселератора (кофеин), который освобождает билирубин из комплекса с белками, чем ускоряет реакцию азосочетания.

Материал исследования

Сыворотка крови.

Реактивы

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

Проведение анализа

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

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

Расчет

Рассчитывают концентрацию общего и прямого билирубина по формуле:

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

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

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

Нормальные величины

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

Клинико-диагностическое значение

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

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

Накопление билирубина в крови свыше 43 мкмоль/л ведет к его связыванию эластическими волокнами кожи и конъюнктивы, проявляется желтухой. Для дифференциальной диагностики типа желтухи определяют, за счет какой фракции билирубина возникает билирубинемия.

1. *Гемолитическая (надпеченочная) желтуха* – ускорено образование билирубина в итоге гемолиза. Гипербилирубинемия развивается за счет фракции непрямого билирубина. В моче резко возрастает содержание уробилина, билирубина нет. В кале увеличено содержание стеркобилина.

Данный тип желтухи может развиваться при V_{12} -дефицитной анемии, гемолитических анемиях различного происхождения (порфирии, несовместимость крови, дефект глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, лекарства).

2. *Паренхиматозная (печеночно-клеточная) желтуха* – нарушено извлечение билирубина печеночными клетками, его конъюгирование и выведение. Гипербилирубинемия за счет обеих фракций: непрямого билирубин возрастает за счет функциональной недостаточности гепатоцитов или снижения их количества, а прямой – за счет цитолиза гепатоцитов. В моче определяется билирубин, умеренно увеличена концентрация уробилина. В кале уровень стеркобилина в норме или снижен. Паренхиматозный тип желтухи отмечается при вирусных и иных формах гепатитов, циррозе, опухолях, жировой дистрофии печени и других состояниях.

3. *Механическая (подпеченочная) желтуха* развивается вследствие нарушения оттока желчи при закупорке желчного протока. Из-за застоя желчи растягиваются желчные капилляры, растет их проницаемость. Не имея оттока в желчь, прямой билирубин поступает в кровь (гипербилирубинемия). В тяжелых случаях переполнение гепатоцитов прямым билирубином нарушает конъюгацию с глюкуроновой кислотой, в крови растет уровень несвязанного билирубина. В моче резко повышен уровень билирубина. В кале нет стеркобилина. Такую желтуху выявляют при желчнокаменной болезни, опухолях поджелудочной железы, гельминтозах.

Оформление работы

Указывают принцип метода, регистрируют результаты, производят расчёты, делают вывод о наличии/отсутствии возможной патологии.

Лабораторная работа 3

Обнаружение билирубина и желчных пигментов в моче

Реактивы

1) диагностические полоски «Билифан», 2) концентрированная H_2SO_4 , 3) концентрированная HNO_3 с примесью HNO_3 , 4) сухой порошок аммония молибдата, 5) 1 % спиртовой раствор I_2 .

Материал для исследования

1) Нормальная моча, 2) патологическая моча с желчью.

ЭКСПРЕСС-МЕТОД

Принцип

Полуколичественное определение билирубина в моче диагностическими полосками «билифан» основано его качественной реакции, дающей продукты с характерным розовым окрашиванием.

Проведение анализа

Диагностическую полоску погружают в мочу и немедленно вынимают. Через 1 мин сравнивают окраску зоны индикации с цветной шкалой на этикетке. Примерную концентрацию билирубина в моче определяют по оттенкам зоны индикации в соответствии с таблицей:

Обозначения на шкале	Содержание билирубина	
	мкмоль/л	мг/л
1	5-10	3-6
2	10-21	6-12
3	21-41	12-24
4	51	30

ПРОБА С МОЛИБДАТОМ АММОНИЯ

Принцип

Желчные пигменты билирубина и биливердина окисляются молибдатом аммония в присутствии H_2SO_4 с образованием синего билицианина.

Проведение анализа

На предметное стекло наносят соль аммония молибдата, каплю мочи с желчью, каплю конц. H_2SO_4 , смешивают стеклянной палочкой. В присутствии билирубина появляется синий цвет.

ПРОБА ГМЕЛИНА

Принцип

Под действием HNO_3 с примесью HNO_2 билирубин окисляется в биливердин (зелёный), билицианин (сине-фиолетовый), холетелин (жёлтый).

Проведение анализа

В пробирку с 5-10 каплями концентрированной HNO_3 по стенке осторожно наслаивают равный объём исследуемой мочи. При наличии в моче желчных пигментов на границе жидкостей появляются цветные кольца. Первым появляется зелёное кольцо биливердина.

Нормальные величины

Моча отсутствие билирубина

Клинико-диагностическое значение

Билирубинурия характерна для обтурационной и паренхиматозной желтухи при повышении уровня прямого билирубина в крови, но отсутствует при гемолитической желтухе. При гепатите билирубин может быть обнаружен в моче до появления желтухи.

Оформление работы

Указывают принципы методов, результаты заносят в таблицу, делают вывод о наличии билирубина и возможной патологии.

Название метода	Материал для исследования	Результат реакции (наличие окраски)
Экспресс- метод	моча	нормальная
		с желчью
Проба с молибдатом аммония	моча	нормальная
		с желчью
Проба Гмелина	моча	нормальная
		с желчью

Вопросы для самоконтроля

1. Строение, функции, метаболизм эритроцита. Значение гликолиза и 2,3-дифосфоглицерата, пентозофосфатного пути и НАДФН. Мембрана эритроцитов: белки, мишени окисления и роль витаминов-антиоксидантов и НАДФН.
2. Гемоглобин как гемопротейн, типы гемоглобина. Транспорт газов эритроцитом, участие O_2 и CO_2 (схемы: в капиллярах легких и в тканях), кооперативность и эффект Бора. Гликозилированный гемоглобин и сахарный диабет.
3. Функции и локализация других гемопротейнов (миоглобин, цитохромы, пероксидаза и каталаза). Гемопротейны и гипоксия.
4. Железо, роль, токсичность. Обмен Fe, нарушения (анемия, гемохроматоз).
5. Синтез и распад гема, гемоглобина, регуляция и нарушения. Роль РЭС, печени и почек в обмене гемоглобина. Заболевания: талассемии, порфирии и др.
6. Желтуха, виды, причины, диагностика. Прямой и непрямой билирубин.

ТЕМА 11.3

НЕОРГАНИЧЕСКИЕ ВЕЩЕСТВА КРОВИ. КИСЛОТНО-ОСНОВНОЕ СОСТОЯНИЕ

Актуальность

Кровь занимает особое место в метаболизме благодаря ряду специфических функций, принадлежащих ее компонентам. Незаменима роль крови в газообмене и регуляции кислотно-основного состояния организма, нарушения которых часто встречаются в клинической практике.

Цель

1. Изучить кислотно-основное состояние крови, механизмы его обеспечения.
2. Освоить методы оценки буферной ёмкости сыворотки крови, содержания хлоридов в сыворотке крови и моче, показателя рН мочи и их клинико-диагностическое значение.

Вопросы для самоподготовки

1. Электролиты плазмы крови:
 - ~макроэлементы (Na, K, Ca, P, Fe, Cl), распределение и значение в организме, нормальные концентрации в плазме крови и факторы, от которых зависит их концентрация в плазме крови;
 - ~микроэлементы (J, Cu, Zn, Co, Se), примеры участия в обмене веществ.
2. Роль эритроцита в изменении концентрации бикарбонат-ионов плазмы, карбоангидраза.
3. Механизм транспорта кислорода. Связывание кислорода с гемоглобином. Кривая насыщения гемоглобина кислородом / диссоциации гемоглобина и кислорода.
4. Схема реакций, происходящих в эритроците, в капиллярах легких и тканей.
5. Показатели кислотно-основного состояния, нормальные величины (Приложение).
6. Химические механизмы регуляции кислотно-основного состояния. Каким образом работают буферные системы крови – фосфатная, белковая, бикарбонатная, гемоглобиновая. Химические реакции. Буферная емкость крови, клинико-диагностическое значение и нормальные показатели.
7. Характеристика и механизмы основных физиологических систем компенсации нарушения кислотно-основного состояния, роль легких и почек. Определение рН мочи, клинико-диагностическое значение.
8. Значение печени и костной ткани в реакциях компенсации нарушений КОС. Механизмы их работы.
9. Влияние секреции желудка и поджелудочной железы на кислотно-основное состояние организма. Роль печени. Определение концентрации ионов хлора в сыворотке крови и моче. Клинико-диагностическое значение и нормальные величины.
10. Основные виды нарушений кислотно-основного состояния – респираторный (дыхательный) ацидоз и алкалоз, метаболический ацидоз и алкалоз, причины, их вызывающие. Изменение показателей кислотно-основного состояния при данных нарушениях. Способы компенсации нарушений.
11. Причины сдвигов кислотно-основного равновесия при нижеперечисленных состояниях, способы их химической и физиологической компенсации:
 - ~сахарный диабет,
 - ~пневмония,
 - ~тканевая гипоксия,
 - ~приступ бронхиальной астмы,
 - ~хронический бронхит,
 - ~отравление этанолом,
 - ~неукротимая рвота,
 - ~диарея,
 - ~хроническая почечная недостаточность (снижение функции почек),
 - ~черепно-мозговая травма с возбуждением дыхательного центра,
 - ~подъем высоко в горы,
 - ~правожелудочковая сердечная недостаточность.

Темы для реферативных сообщений

1. Сочетанные нарушения кислотно-основного состояния.
2. Методы определения показателей КОС в клинико-лабораторной практике.

Лабораторная работа 1

Определение буферной емкости сыворотки крови

Актуальность

Сила буферных систем определяется их буферной емкостью, т.е. количеством молей кислоты или основания, которое необходимо добавить к буферному раствору, чтобы сместить его активную реакцию на единицу.

Принцип метода

Для определения буферной емкости сыворотки в отношении кислых продуктов ее титруют кислотой с индикатором метилоранж. Для определения буферной емкости в отношении щелочных продуктов пробу сыворотки титруют щелочью с индикатором фенолфталеином.

Реактивы

- 1) 0,1 М раствор HCl, 2) 0,1 М раствор NaOH, 3) 0,5 % спиртовой раствор метилоранжа, 4) 0,5 % спиртовой раствор фенолфталеина.

Материал для исследования

Сыворотка крови.

Проведение анализа

1. В коническую колбу вносят 1 мл сыворотки крови, 2-3 капли 0,5 % раствора метилоранжа. В сыворотке крови (рН выше 4,5) метилоранж окрашивается в желтый цвет. Содержимое колбы титруют 0,1 М раствором HCl до изменения цвета индикатора на красный. Отмечают объем, пошедший на титрование.
2. В коническую колбу вносят 1 мл сыворотки крови, 2-3 капли 0,5 % раствора фенолфталеина. В сыворотке крови (при рН ниже 8,2) смесь остается бесцветной. Содержимое колбы титруют из бюретки 0,1 М раствором NaOH до слабо-розового окрашивания. Отмечают объем, пошедший на титрование.

Расчет

Рассчитывают отношение (К) пошедшего на титрование количества соляной кислоты (в мл) к количеству раствора NaOH (в мл), пошедшего на титрование.

$$K = \text{HCl (мл)} : \text{NaOH(мл)}$$

Нормальные величины

Кислота : щелочь = 20 : 1

Клинико-диагностическое значение

Возрастание соотношения в пользу HCl (увеличение ее затрат) свидетельствует о недостаточности кислых веществ в крови и состоянии алкалоза. Увеличение количества израсходованного раствора NaOH указывает на избыток кислых эквивалентов в крови и состояние ацидоза.

Виды нарушений кислотно-основного состояния:

Выделяют четыре основных вида нарушений кислотно-основного состояния: респираторный ацидоз и алкалоз, метаболический ацидоз и алкалоз. Дополнительно среди этих нарушений обычно различают острые и хронические состояния, компенсированные и декомпенсированные состояния.

Метаболический ацидоз – самая частая и тяжелая форма нарушения кислотно-основного состояния. В основе его лежит накопление в организме нелетучих кислых продуктов (молочная, β-оксимасляная и ацетоуксусная кислоты и др.). Причины: а) избыточное образование органических кислот – декомпенсированный сахарный диабет (кетацидоз), врожденные

нарушения метаболизма, голодание и гипоксия (лактацидоз), общий наркоз, отравление этанолом, метанолом, заболевания печени, легочная и сердечная недостаточность, нарушения кровообращения, инфекции, анемии; б) нарушение выведения кислых продуктов – острая и хроническая почечная недостаточность, сопровождающаяся задержкой ионов NH_4^+ , SO_4^{2-} , HPO_4^{2-} ; в) потеря бикарбоната – почечная канальцевая недостаточность, диарея; г) избыточное введение кислот - с токсичными жидкостями или при отравлении лекарственными препаратами.

Респираторный ацидоз – характеризуется увеличением концентрации углекислоты и повышением парциального давления CO_2 в крови выше 50 мм рт.ст.. Причины: а) высокая концентрация CO_2 во вдыхаемом воздухе; б) недостаточность легочной вентиляции вследствие угнетения дыхательного центра, стеноза дыхательных путей, отека гортани, хронического бронхита, уменьшения активной массы легких.

Метаболический алкалоз – состояние дефицита водородных ионов в крови в сочетании с избытком оснований. Часто сопровождается снижением содержания калия в крови. Причины: а) потеря HCl при рвоте; б) потеря H^+ в почках, избыток минералокортикоидов; в) накопление бикарбонатов при передозировке нейтрализующих ацидоз препаратов; г) дефицит K^+ .

Респираторный алкалоз – характеризуется снижением $p\text{CO}_2$ ниже 36 мм рт.ст. и повышением pH выше 7,5 при неадекватно высокой легочной вентиляции по сравнению с продукцией углекислоты в организме. Причины: а) возбуждение дыхательного центра – опухоль, черепно-мозговая травма, энцефалит; б) гипервентиляция при гипоксии – горная болезнь, пониженное содержание O_2 во вдыхаемом воздухе.

Изменения показателей кислотно-основного состояния при ацидозе и алкалозе отражены в таблице (\uparrow - увеличение, \downarrow - снижение).

Тип нарушения		pH	$p\text{CO}_2$	Избыток оснований	$[\text{HCO}_3^-]$
Метаболический	ацидоз	\downarrow	Норма (или \downarrow)*	\downarrow	\downarrow
	алкалоз	\uparrow	Норма (или \uparrow)*	\uparrow	\uparrow
Респираторный	ацидоз	\downarrow	\uparrow	Норма (или \uparrow)**	Норма (или \uparrow)**
	алкалоз	\uparrow	\downarrow	Норма (или \downarrow)**	Норма (или \downarrow)**
Примечание: * – при метаболических нарушениях изменение $p\text{CO}_2$ компенсаторное, ** - при респираторных нарушениях сдвиги избытка оснований и $[\text{HCO}_3^-]$ являются компенсаторными.					

Оформление работы

Указывают принцип метода, регистрируют результаты, делают вывод о возможной патологии.

Лабораторная работа 2 Определение величины pH мочи

Актуальность

Реакция мочи зависит от количества свободных водородных ионов H^+ , образующихся в результате диссоциации органических и неорганических кислот, которые возникают во время катаболических процессов в организме. Ионы H^+ в дистальной части почечного канальца связываются с буферными основаниями, только их небольшая часть выводится с мочой в свободном виде. Водородный показатель (pH) не является количественным, а лишь указывает на реакцию мочи (в норме нейтральная или слабокислая).

Показатель pH у практически здоровых людей изменяется в довольно широких пределах в зависимости от режима питания и состава потребляемой пищи. Прием преимущественно мясной пищи ведет к окислению мочи, а молочно-растительная диета и употребление значительного количества щелочной минеральной воды - к увеличению pH . Помимо характера

пищи на рН мочи влияют различные метаболические процессы, происходящие в организме, и функциональное состояние канальцев почек. Поэтому реакция мочи имеет ограниченное клиническое значение.

Принцип метода

Определение проводят с помощью индикаторной бумаги или диагностических полосок, имеющих тест-зону для определения рН. Зона индикации диагностических полосок содержит смешанный кислотно-основной индикатор с переходом оранжевой окраски в желтую и далее в зеленую до появления синего цвета в диапазоне рН 5,0-9,0.

Материал для исследования

Моча.

Проведение анализа

Не прикасаясь руками к зоне индикации, берут из упаковки полоску, погружают на 1-2 с в исследуемую мочу. Капли мочи удаляют, проводя полоской по краю сосуда. Полоски оставляют в горизонтальном положении. Через 1 мин по цветной шкале на упаковке определяют величину рН.

Нормальные величины

Моча 5,0-7,0

Влияющие факторы

При белковом питании реакция мочи кислая, при растительной диете – щелочная. У вегетарианцев рН мочи около 7,0. Кислая реакция мочи обусловлена, прежде всего, ионами H_2PO_4^- и NH_4^+ , щелочная – HCO_3^- .

Клинико-диагностическое значение

Щелочная реакция мочи отмечается при циститах и пиелитах, сильной рвоте, введении бикарбоната натрия и употреблении щелочных минеральных вод. Резко кислая реакция мочи наблюдается при лихорадочных состояниях, сахарном диабете, голодании и др. Кислотность мочи определяет возможность образования тех или иных типов мочевых камней. Мочекислые камни (уратные) чаще всего образуются при рН ниже 5,5, оксалатные – при рН 5,5-6,0, кальций-фосфатные – при рН 7,0-7,8.

Оформление работы

Указывают принцип метода, регистрируют результат, делают вывод о возможной патологии.

Лабораторная работа 3

Определение содержания хлоридов в сыворотке крови и моче

Принцип

В присутствии ионов хлора в кислой среде тиоцианат ртути образует тиоцианат-ионы, образующие окрашенный комплекс с ионами железа Fe^{3+} . Интенсивность окраски пропорциональна концентрации хлорид-ионов в пробе и определяется колориметрически.

Материал для исследования

1) Сыворотка крови, 2) моча в разведении 1:2.

Реактивы

1) Рабочий реагент (смесь 2 ммоль/л тиоцианата ртути $\text{Hg}(\text{SCN})_2$, 30 ммоль/л нитрита железа $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, 4 ммоль/л азотной кислоты HNO_3), 2) 100 ммоль/л стандартный раствор NaCl .

Проведение анализа

	Опыт 1, мл	Опыт 2, мл	Стандарт, мл
Сыворотка	0,01	-	-
Моча, разведение 1:2	-	0,01	-
Раствор NaCl	-	-	0,01
Рабочий реагент	2,0	2,0	2,0

Перемешивают, инкубируют 5 мин, измеряют экстинкцию стандарта и опытных проб против воды при длине волны 490 нм (синий светофильтр) в кювете 0,5 см.

Расчет

Содержание хлоридов в сыворотке крови [ммоль/л] = $\frac{E_{оп}}{E_{ст}} \cdot C_{ст}$

Содержание хлоридов в моче [ммоль/сут] = $\frac{E_{оп}}{E_{ст}} \cdot C_{ст} \cdot 2 \cdot Д$,

где: $E_{оп}$ и $E_{ст}$ – оптическая плотность опытных проб и стандартной проб, $C_{ст}$ – концентрация хлорида в стандартном растворе, 2 – разведение мочи, Д – величина диуреза (1300–1500 мл/сут).

Нормальные величины

Сыворотка 97-108 ммоль/л

Моча 120-240 ммоль/сут

Клинико-диагностическое значение

Сыворотка крови. Содержание ионов хлора повышается при обезвоживании (недостаточное поступление жидкости), при заболеваниях почек, декомпенсации сердца, гипервентиляции (респираторный алкалоз), гипофункции коры надпочечников. Снижение выявляется при обезвоживании (потере жидкости – рвота, понос, потоотделение), стенозе привратника, почечном диабете, желудочной гиперсекреции, недостаточности коры надпочечников, увеличении объема внеклеточной жидкости, инфекционных заболеваниях и других патологиях. Значительная гипохлоремия может привести к компенсаторному росту фракций остаточного азота с целью сохранения постоянства осмотического давления.

Моча. Концентрация ионов Cl⁻ нарастает при недостаточности коры надпочечников, нефритах, применении диуретиков; снижается при большой потере хлора через ЖКТ, голодании, синдроме Иценко-Кушинга, сильном потоотделении.

Оформление работы

Указывают принцип метода, регистрируют результаты, делают расчёты и выводы о возможной патологии.

Вопросы для самоконтроля

1. Неорганические вещества крови, разнообразие, значение.
2. Кислотно-основное состояние, основные параметры в норме.
3. Буферные системы организма, буферная емкость.
4. Гемоглобин: роль в транспорте кислорода и углекислого газа, сопряженная с поддержанием КОС. Пути транспорта и транспортные формы CO₂.
5. Быстрые неполные и долговременные полные механизмы компенсации нарушений КОС (буферные системы, легкие, почки).
6. Детоксикационная функция почек по утилизации аммиака в организме, сопряжение амониогенеза с ацидогенезом и реабсорбцией натрия.
7. Образование соляной кислоты в желудке, метаболический алкалоз.
8. Минеральная фаза костной и зубных тканей и возможности гидроксиапатитов в связывании и нейтрализации ионов водорода при поддержании КОС.
9. Метаболические и газовые сдвиги КОС. Основной сдвиг и его компенсация. Нарушения КОС при заболеваниях.

ТЕМА 11.4

ВОДНО-СОЛЕВОЙ ОБМЕН.

НОРМАЛЬНЫЕ И ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ КОМПОНЕНТЫ МОЧИ

Актуальность

Почки участвуют в регуляции водно-солевого баланса, поддержании кислотно-основного состояния, осмотического давления жидкостей организма, кровяного давления, стимуляции эритропоэза, процессах детоксикации и выведения веществ. Объем и состав образуемой в почках мочи может меняться в значительных пределах, отражая состояние водно-солевого обмена и других сторон метаболизма организма. Обследование каждого больного в стационаре и в амбулаторных условиях должно сопровождаться обязательным анализом мочи, так как это исследование может помочь в постановке диагноза, а нередко совершенно изменить первоначальные диагностические предположения, оценить эффективность проводимой терапии.

Цель

1. Изучение механизмов образования мочи, общих свойств и химического состава мочи в норме и при патологии, роли почек в поддержании водно-солевого обмена и КОС.
2. Освоение методов оценки физико-химических параметров мочи.

Вопросы для самоподготовки

1. Метаболизм почек. Отличие обмена веществ в корковом и мозговом слоях. Локализация аэробного и анаэробного окисления глюкозы, глюконеогенеза и особенности обмена белков и липидов в почках. Роль почек в синтезе биологически активных веществ (креатин, эритропоэтин, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$).
2. Роль ферментов в реализации функции почек – глицинаминдотрансфераза, Na^+, K^+ -АТФаза, глутаматдегидрогеназа, глутаминдезаминаза, щелочная фосфатаза, изоферменты лактатдегидрогеназы.
3. Потребность в чистой воде, источники воды в организме и пути ее выведения. Роль кожи, легких, органов ЖКТ и почек в выведении воды. Рециркуляция воды между кровью и ЖКТ, кровью и почками.
4. Факторы, влияющие на количество воды в организме – объём циркулирующей крови и осмоляльность, артериальное давление, концентрация Na^+ и K^+ .
5. Схема строения нефрона. Процессы образования мочи: фильтрация, реабсорбция и секреция. Места действия и эффект гормонов, регулирующих минеральный и водно-солевой обмена.
6. Характеристика фильтрации, факторы, влияющие на ее скорость и величину. Оценка скорости клубочковой фильтрации в клинической практике. Клиренс и вещества, используемые для его определения. Метод определения клиренса веществ по креатинину.
7. Реабсорбция, биохимические реакции в просвете канальца и в клетках проксимального и дистального отделов нефрона. Противоточно-умножительный механизм концентрирования мочи. Транспорт-максимум для глюкозы.
8. Регуляция реабсорбции воды. Роль антидиуретического гормона, стимуляция его синтеза и выделения. Метаболические последствия и клинические проявления гипофункции антидиуретического гормона.
9. Регуляция реабсорбции натрия. Активация и функционирование системы «ренин-ангиотензин-альдостерон», роль системы в реабсорбции натрия (схема). Механизм возникновения гипертензии при нарушении кровообращения в почках, причины таких нарушений.
10. Регуляция реабсорбции кальция. Роль $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, паратгормона и кальцитонина в обмене кальция.
11. Роль почек в поддержании кислотно-основного состояния – реабсорбция бикарбонатов, ацидогенез, аммионогенез, выделение органических кислот.

12. Общие свойства мочи здорового человека: количество, цвет, прозрачность, запах, рН, относительная плотность, поверхностное натяжение. Нормальные величины. Изменение этих показателей при патологических состояниях. Методы и диагностическое значение определения физико-химических свойств мочи (плотность, величина рН). Визуально оцениваемые параметры, их клиническое значение.
13. Органические и неорганические компоненты мочи здорового человека.
14. Причины появления патологических компонентов мочи: белок, глюкоза, кетоновые тела, желчные пигменты (билирубин, уробилиноген), кровь (гемоглобин, эритроциты), ферменты. Методы, диагностическое значение оценки патологических компонентов мочи.

Темы для реферативных сообщений

1. Физиологическая и патологическая протеинурия и креатинурия.
2. Механизмы действия диуретических средств. Использование диуретиков в клинической практике.

Лабораторная работа 1

Оценка физико-химических свойств мочи

Материал для исследования

- 1) Нормальная моча, 2) образцы патологической мочи № 1, 2, 3.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНОЙ ПЛОТНОСТИ МОЧИ

Принцип

Относительная плотность (удельный вес) мочи пропорциональна концентрации растворенных в ней веществ (органических соединений и электролитов) и отражает концентрационную способность почек.

Оборудование

Урометры двух типов (со шкалой 1,000–1,030 и шкалой 1,030–1,060), высокий цилиндр.

Проведение анализа

При наличии пены на поверхности мочи удаляют её фильтровальной бумагой. Если мочи мало, то перед исследованием её можно развести в 2–3 раза дистиллированной водой, а потом полученный результат умножить на степень разведения.

В высокий узкий цилиндр наливают по стенке мочу и осторожно погружают в неё урометр так, чтобы он не касался стенок и дна цилиндра. Производят отсчёт по шкале урометра, используя нижний мениск жидкости.

В случае большой относительной плотности мочи берут второй тип урометра (шкала 1,030–1,060). Если моча имеет температуру, не соответствующую условиям, отмеченным на урометре, то на каждые 3°С выше или ниже этой температуры соответственно добавляют или отнимают по 0,001 от показаний шкалы урометра.

Нормальные величины

Моча 1,008–1,026.

Клинико-диагностическое значение

У здорового человека относительная плотность мочи зависит от многих условий, но в основном от суточного диуреза – чем выше диурез, тем она ниже. У здоровых людей сумма первых двух цифр суточного диуреза и последующих двух цифр относительной плотности мочи обычно составляет 30 (например, если суточный диурез 1100 мл и относительная плотность 1019 г/л, то 11+19=30). Относительная плотность нормальной мочи прямо зависит от концентрации растворимых веществ и находится в обратной зависимости от количества выделяемой мочи. Увеличение относительной плотности мочи отмечается при сахарном диабете (глюкозурия), поражении гломерулярного фильтра (протеинурия). Снижение плотности связано с полиурией любой этиологии.

ОЦЕНКА ОКРАСКИ (ЦВЕТА) МОЧИ

Принцип

Цвет мочи зависит от содержания пигментов (урохрома, уробилина, порфирина) и тесно связан с плотностью (обусловлена концентрацией растворенных в моче веществ и реакцией), более интенсивную окраску имеет концентрированная моча и моча с кислой реакцией. Необычная окраска мочи может появиться при употреблении овощей и фруктов яркой окраски (свекла, земляника, морковь и др.), лекарств (амидопирин, рибофлавин) и иных веществ.

Проведение анализа

Окраску образца мочи оценивают визуально в процессе измерения относительной плотности, когда моча находится в длинном прозрачном цилиндре.

Нормальные величины

Моча от янтарно-желтого до соломенно-желтого.

Клинико-диагностическое значение

Повышение интенсивности окраски мочи (гиперхромурия) – при уменьшении её выделения за счет потери жидкости при поносах, рвоте, лихорадочных состояниях. Снижение интенсивности окраски мочи (гипохромурия) – при различных видах полиурии (особенно сахарном и несахарном диабете), нефросклерозе.

Характерное изменение окраски мочи может свидетельствовать о патологии: зеленовато-бурый (цвет «пива») – механическая желтуха вследствие билирубинурии; зеленовато-желтый – паренхиматозная желтуха вследствие билирубинурии, уробилиногенурии; от зеленовато-желтого до грязно-коричневого – пиурия; цвет «мясных помоев» – гематурия и гемоглобинурия при органических заболеваниях почек (острый нефрит); красно-коричневый – метгемоглобинурия; красно-бурый – миоглобинурия и острый инфаркт миокарда; синий – индикурия, употребление метиленовой сини; молочно-белый – липурия и хилурия при поражении канальцев почек; чёрно-бурый – алкаптонурия, меланоз, малярия; чёрный – меланинурия при меланосаркоме, гемоглобинурия при острой гемолитической почке.

ОЦЕНКА ПРОЗРАЧНОСТИ МОЧИ

Проведение анализа

Прозрачность образца мочи оценивают визуально в процессе измерения относительной плотности, когда моча находится в длинном прозрачном цилиндре.

Нормальные величины

Моча прозрачна.

Клинико-диагностическое значение

Помутнение мочи практически всегда обусловлено выпадением в осадок солей, большим количеством лейкоцитов, бактерий, эпителиальных клеток, почечных цилиндров, слизи, свидетельствуя о наличии воспалительного процесса в мочевыводящей системе.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ pH

Принцип

Основан на изменении цвета индикатора в соответствии со значением pH определяемого раствора.

Проведение анализа

Полоску индикаторной бумаги опускают в пробирку с мочой и по изменению цвета, сравнивая с эталонной шкалой на упаковке, устанавливают pH исследуемой мочи.

Нормальные величины

Моча 5,0-6,5

Клинико-диагностическое значение

См. лабораторную работу 2, тема 11.3.

Оформление работы

Указывают принцип метода, регистрируют результаты в таблице и далее используют их для формулирования выводов в лабораторной работе 2.

Образцы мочи	Выявляемый показатель			
	Плотность	Цвет	Прозрачность	pH
Норма				
Образец №...				

Лабораторная работа 2

Экспресс-определение патологических компонентов мочи

Материал для исследования

1) Нормальная моча, 2) образцы патологической мочи № 1, 2, 3.

Оборудование

Тест-полоски "Глюкофан", "Кетофан", "Диафан", "Альбуфан", "Билифан", "Иктофан", "Пентафан".

Проведение анализа

Не прикасаясь руками к зоне индикации, из упаковки берут полоску, погружают зону индикации на 1-2 сек в образец мочи. Капли удаляют, проведя полоской по краю сосуда. Полоски оставляют в горизонтальном положении. Через 1 мин по цветной шкале упаковки определяют концентрацию искомого вещества.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ ТЕСТ-ПОЛОСКАМИ "ГЛЮКОФАН"

Принцип

Принцип определения глюкозы основан на глюкозооксидазной реакции. Зона индикации пропитана растворами ферментов глюкозооксидазы, пероксидазы и красителем тетраметилбензидином. Глюкоза с помощью глюкозооксидазы окисляется кислородом воздуха до глюконовой кислоты с образованием перекиси водорода. Перекись водорода в присутствии фермента пероксидазы окисляет краситель, в результате чего желтая окраска переходит в зеленую.

Нормальные величины

Глюкоза	Тест-полоски "Глюкофан"	проба отрицательна
	другие методы	0,1-0,8 ммоль/л (1-15 мг/100 мл (мг%))

Клинико-диагностическое значение

Содержание глюкозы в моче возрастает при всех случаях гипергликемии свыше 10 ммоль/л (почечного порога). Глюкозурии могут быть физиологическими и патологическими.

К физиологическим относятся алиментарная глюкозурия, глюкозурия беременных и нейрогенная глюкозурия на почве стрессовых состояний.

Патологическая глюкозурия обнаруживается при гипергликемии (сахарный диабет, тиреотоксикоз, акромегалия, гиперплазия коры надпочечников, инфаркт миокарда, отравления морфином, фосфором, кровоизлияния во внутренние органы, острые инфекции и нервные заболевания), при повреждениях почечных канальцев (пиелонефриты, гломерулонефриты, токсические поражения почек, почечный диабет (семейная почечная глюкозурия)), нефропатии.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЕТОНОВЫХ ТЕЛ ТЕСТ-ПОЛОСКАМИ "КЕТОФАН"

Принцип

Тест основан на реакции Легаля. Жёлтая зона индикации на полосках содержит щелочной буфер в смеси с нитропруссидом натрия, дающий с ацетоном и ацетоуксусной кислотой красное, вишневое или фиолетовое окрашивание. Проба более чувствительна к ацетоуксусной кислоте, чем к ацетону, с β -гидроксимасляной кислотой индикатор не реагирует. Интенсивность окраски отражает только концентрацию ацетоуксусной кислоты в моче.

Нормальные величины

Кетоновые тела	тест-полоски "Кетофан"	проба отрицательна
	другие методы	20-30 мг/сут

Клинико-диагностическое значение

Кетоновые тела в моче (кетонурия) появляются при кетонемии, которая возникает при голодании, сахарном диабете, повышении концентрации жиромобилизующих гормонов в крови.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА ТЕСТ-ПОЛОСКАМИ "АЛЬБУФАН"

Принцип

Тест основан на изменении цвета с желтого до зелено-голубого кислотно-основных индикаторов (тетрабромфенолового синего и эфира тетрабромфенолфталеина) под влиянием белков. Проба наиболее чувствительна к альбуминам, значительно менее чувствительна к глобулинам, мукопротеинам, гемоглобину. При сильно щелочном рН мочи проба может давать ложноположительные результаты.

Нормальные величины

Белок	Тест-полоски "Альбуфан"	проба отрицательна
	Другие методы	10-140 мг/л

Клинико-диагностическое значение

Небольшое количество белка в суточной моче обнаруживают и у практически здоровых лиц, однако в разовой порции мочи такие концентрации обычными методами не выявляются. Часть этих белков сывороточного происхождения, другая часть – продукт клеток мочевыводящих путей.

В зависимости от места возникновения протеинурию подразделяют на преренальную (связана с усиленным распадом белка тканей или выраженным гемолизом), ренальную (обусловлена патологией клубочков или канальцев почек) и постренальную (связана с воспалением мочевыводящих путей).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИЛИРУБИНА И УРОБИЛИНОГЕНА ТЕСТ-ПОЛОСКАМИ "ИКТОФАН"

Принцип

Полоски содержат две зоны индикации – для билирубина и для уробилиногена. Первый тест основан на реакции сочетания билирубина со стабилизированным диазореактивом. Реакционная зона содержит п-нитрофенилдиазониевый п-толуолсульфонат, натриевый бикарбонат и сульфосалициловую кислоту. При контакте с конъюгированным (прямым) билирубином через 30 сек появляется сиреневато-бежевая (сиреневато-розовая) окраска, интенсивность которой зависит от количества определяемого билирубина. Во втором тесте определение уробилиногена основано на реакции азосочетания уробилиногена со стабилизированной солью диазония. Реакционная зона меняет цвет в присутствии уробилиногена на розовый или красный.

Нормальные величины

Билирубин	проба отрицательна
Уробилиноген	до 17,0 мкмоль/л

*ОПРЕДЕЛЕНИЕ рН, ГЛЮКОЗЫ, КЕТОНОВЫХ ТЕЛ, БЕЛКА И КРОВИ
ТЕСТ-ПОЛОСКАМИ "ПЕНТАФАН"*

Принцип

Диагностические полоски "Пентафан" имеют 5 зон индикации для определения кетоновых тел, крови, глюкозы, белка и величины рН.

Принцип определения рН заключается в переходе цвета смешанного кислотно-основного индикатора в диапазоне рН 5,0-9,0 от оранжевой окраски в желтую, далее в зеленую до появления синего цвета.

Принцип определения крови такой же, как полосками "Гемофан", белка - такой же, как полосками "Альбуфан", кетоновых тел - такой же, как полосками "Кетофан", глюкозы такой же, как полосками "Глюкофан".

Нормальные величины

Белок	тест-полоски "Альбуфан" Другие методы	Проба отрицательна 10-140 мг/л
Кетоновые тела	тест-полоски "Кетофан" другие методы	Проба отрицательна 20-30 мг/сут
Глюкоза	тест-полоски "Глюкофан" другие методы	Проба отрицательна 0,1-0,8 ммоль/л или 1-15 мг/100 мл (мг%)
Эритроциты и Нв рН	взрослые	Проба отрицательна 5,0-6,5

Оформление работы

Указывают принципы методов, регистрируют полученные результаты исследования образцов мочи в виде таблицы и, учитывая результаты "Лабораторной работы 1", делают общие выводы о возможной патологии.

(Для анализа мочи на патологические компоненты можно использовать другие варианты существующих экспресс-тестов, соответствующих выполнению поставленной задачи исследования).

Показатель	Вид теста	Образцы мочи			
		Норма	№ 1	№ 2	№ 3
рН	Пентафан				
Глюкоза	Глюкофан Диафан Пентафан				
Белок	Альбуфан Пентафан				
Кетоновые тела	Кетофан Диафан Пентафан				
Билирубин	Билифан Иктофан				
Уробилиноген	Иктофан				
Гемоглобин	Гемофан				
Эритроциты	Гемофан				

Лабораторная работа 3

Определение содержания креатинина в моче

Принцип

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

Реактивы

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

Материал для исследования

Моча (разведение 1:50)

Проведение анализа

	Опыт, мл	Стандарт, мл
Моча	0,5	-
Стандартный раствор креатинина	-	0,5
Дистиллированная вода	0,5	0,5
NaOH	0,5	0,5
Насыщенный раствор пикриновой кислоты	0,5	0,5
Перемешивают, инкубируют 20 мин, измеряют оптическую плотность пробы против H ₂ O, длина волны 500-560 нм, кювета 0,5 см		

Расчет

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

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

Нормальные величины

Сыворотка	женщины	44-88 мкмоль/л
	мужчины	44-100 мкмоль/л
Суточная моча		4,4-17,7 ммоль/сут

Клинико-диагностическое значение

Увеличение концентрации креатинина в моче: при повышенной физической активности, лихорадочных состояниях, выраженной недостаточности функции печени, сахарном и несахарном диабете, синдроме длительного раздавливания, острых инфекциях. Снижение показателя: при хроническом нефрите, мышечной атрофии, дегенерации и амилоидозе почек, лейкемии, голодании. Содержание креатинина не является чувствительным тестом в ранней стадии заболевания почек.

Оформление работы

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

Лабораторная работа 4

Проба Реберга: определение клиренса креатинина (теоретически)

Материал для исследования

1) сыворотка крови. 2) моча.

Принцип

Если вещество присутствует в плазме в стабильной концентрации, физиологически инертно, свободно фильтруется в клубочках, а также не секретируется, не реабсорбируется, не синте-

зируется и не превращается в почках, то количество этого вещества, профильтрованного в клубочках, равно количеству, выведенному с мочой. Образовавшийся в организме креатинин практически полностью фильтруется в почечных клубочках и не подвергается реабсорбции в почечных канальцах. Соотношение концентраций креатинина в моче и плазме крови за определенный промежуток времени позволяет судить о фильтрующей способности почек.

Проведение анализа

Обследуемый выпивает натощак 400-500 мл воды или слабого чая. Немедленно идет в туалет. После мочеиспускания отмечают точное время. Ровно через 30 мин из вены берут кровь и определяют в ней концентрацию креатинина. Через час полностью собирают мочу и определяют её общий объем, вычисляют минутный диурез, определяют концентрацию креатинина в моче (см "Определение содержания креатинина в сыворотке крови и моче").

Расчет

$$C = \frac{U}{P} \cdot C_D,$$

где: С – показатель клиренса (мл/мин), D – минутный диурез (мл/мин), U и P – концентрация креатинина в моче и плазме, соответственно.

Нормальные величины

Скорость клубочковой фильтрации по креатинину 80-120 мл/мин

Клинико-диагностическое значение

Креатинин является единственным веществом, полностью фильтруемым почками и не подвергаемым реабсорбции, поэтому клиренс креатинина принимают за 100 % и сравнивают с ним клиренс любого иного вещества.

Повышение скорости клубочковой фильтрации наблюдается при увеличении сердечного выброса, при беременности, отравлении окисью углерода, белковой диете и гиперкатаболических состояниях, анемии.

Снижение показателя клиренса выявляется при шоке, кровотечении, дегидратации, сердечной недостаточности, различных патологиях почек, гипофункции коры надпочечников.

Оформление работы

Отмечают принцип метода, указывают ценность показателя и клинико-диагностическое значение анализа.

Вопросы для самоконтроля

1. Функции почек, роль коркового и мозгового вещества. Нефрон, противоточно-умножительный механизм образования мочи. Состав, параметры мочи.
2. Секреция и реабсорбция (глюкоза, натрий, вода и др.). Почечный порог.
3. Гормоны, регулирующие водно-электролитный обмен, строение и эффекты. Места и химизм синтеза альдостерона, механизм действия на клетку, роль. Система «ренин-ангиотензин-альдостерон» и антидиуретический гормон.
4. Гормоны, регулирующие минеральный обмен, их строение и эффект в организме. Места и химизм синтеза паратгормона, кальцитонина, кальцитриолов, механизм действия на клетку, взаимодействие в организме.
5. Детоксикационная функция почек по утилизации и выведению аммиака и других азотистых продуктов. Остаточный азот мочи. Почки в синтезе креатина, роль креатинфосфата, клиренс креатинина и др.
6. Химизм аммионогенеза и сопряжение с ацидогенезом и реабсорбцией натрия. КОС и почки, буферные системы организма и аммиачный буфер.
7. Патологические компоненты мочи. Моча при сахарном диабете, патологии почек. Виды протеинурии. Появление билирубина, желчных кислот, крови.

Тестовые задания

Выбрать один правильный ответ.

1. ФУНКЦИЕЙ ФРАКЦИИ АЛЬБУМИНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) транспорт эндогенных метаболитов
- 2) участие в острофазных реакциях
- 3) участие в свертывании крови
- 4) регуляция белкового обмена
- 5) участие в иммунных реакциях

2. ДЛЯ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПРИ ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ ЖЕЛТУХЕ ХАРАКТЕРНО

- 1) повышение концентрации прямого билирубина
- 2) увеличение количества желчных кислот
- 3) накопление непрямого билирубина
- 4) повышение концентрации гемоглобина
- 5) увеличение количества гемосидерина

3. К ИНГИБИТОРАМ ПРОТЕИНАЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ ОТНОСЯТ

- 1) фибронектин
- 2) α_2 -макроглобулин
- 3) гаптоглобин
- 4) церулоплазмин
- 5) реактин

4. БЕЛКАМИ ПЛАЗМЫ КРОВИ, АКТИВНО УЧАСТВУЮЩИМИ В РЕАКЦИЯХ ИММУНИТЕТА, ЯВЛЯЮТСЯ

- 1) альбумины
- 2) фетопроотеины
- 3) компоненты системы комплемента
- 4) церулоплазмины
- 5) трансферрины

5. СОБСТВЕННО ПЛАЗМЕННЫМ (ПЛАЗМОСПЕЦИФИЧНЫМ ФУНКЦИОНАЛЬНЫМ) ФЕРМЕНТОМ ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) аланинаминотрансфераза
- 2) аспаргатаминотрансфераза
- 3) щелочная фосфатаза
- 4) холинэстераза
- 5) лактатдегидрогеназа

6. РАЗВИТИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО АЛКАЛОЗА МОЖЕТ БЫТЬ СВЯЗАНО

- 1) с гемолитической анемией
- 2) с неукротимой рвотой
- 3) с сахарным диабетом
- 4) с гипервентиляцией легких
- 5) с гипофункцией почек

7. СРЕДИ РЕГУЛЯТОРОВ ВОДНО-СОЛЕВОГО БАЛАНСА ОРГАНИЗМА ОТСУТСТВУЕТ

- 1) антидиуретический гормон
- 2) ренин–альдостероновая система
- 3) атриопептиновая система
- 4) гипоталамо–гипофизарно–надпочечниковая система
- 5) система ангиотензин I – ангиотензин II

8. В ПОЧКАХ РЕГУЛИРУЕМАЯ РЕАБСОРБЦИЯ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ ПРОИСХОДИТ

- 1) в проксимальных канальцах
- 2) в дистальных канальцах
- 3) в восходящей части петли Генле
- 4) в собирательных трубочках
- 5) на всем протяжении нефрона

9. ПОЧКИ УЧАСТВУЮТ В ПОВЫШЕНИИ УРОВНЯ pH КРОВИ БЛАГОДАРЯ АКТИВАЦИИ

- 1) секреции мочевины
- 2) реабсорбции натрия
- 3) реабсорбции H_2O
- 4) секреции урата
- 5) аммиониогенеза

10. СНИЖЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ КРЕАТИНИНА В МОЧЕ ПРОИСХОДИТ

- 1) при нарушении функции почек со снижением фильтрации
- 2) в случае угнетения реабсорбции воды и глюкозы
- 3) при нарушении синтетической функции печени
- 4) при нарушении синтетической функции почек
- 5) в случае усиления распада нуклеопротеинов в тканях

Ситуационные задачи

Ответы подробно пояснить.

1. У больного диагностирован сахарный диабет I типа. Содержание глюкозы в плазме крови пациента, взятой натощак, оказалось равным 15 ммоль/л, гликированного гемоглобина 8,5 %. *Указать, следствием чего является гликирование гемоглобина. Пояснить, есть ли глюкоза в моче и каковы возможные причины её появления. Назвать характерные изменения биохимических показателей, выявляемые в крови и моче при сахарном диабете.*
2. У больного выявлено значительное увеличение показателя остаточного азота крови. *Пояснить, можно ли на основании этого анализа говорить о заболевании почек.*
3. У больного затруднено дыхание, оно становится поверхностным, pH крови 7,31, pCO_2 равен 52 ммоль/л, показатель $[HCO_3^-]$ равен 37 ммоль/л, щелочной резерв увеличен. *Пояснить, какой вид нарушения кислотно-основного состояния имеется у больного. Указать механизмы компенсации.*
4. При неправильной эксплуатации печного отопления у людей часто происходит отравление угарным газом. *Объяснить, что происходит с гемоглобином крови при отравлении CO. Показать, как влияет структура гемоглобина на его функцию. Назвать, какие ферменты плазмы крови с четвертичной структурой имеют диагностическое значение, и пояснить, какие из их изоферментов используют в диагностике инфаркта миокарда и почему.*

РАЗДЕЛ 12

РОТОВАЯ ЖИДКОСТЬ. ДЕСНЕВАЯ ЖИДКОСТЬ И ПАРОДОНТ

ТЕМА 12.1

РОТОВАЯ ЖИДКОСТЬ. ДЕСНЕВАЯ ЖИДКОСТЬ И ПАРОДОНТ

Актуальность

Ротовая жидкость (в обиходе слюна) – многокомпонентная биологическая жидкость, оказывающая влияние на органы и ткани полости рта. Ротовая жидкость содержит органические соединения (белки, ферменты, полипептиды, липиды, витамины, гормоны, кислоты), низкомолекулярные азотистые вещества (мочевина, нитраты, нитриты, аммиак, тиоцианаты/роданиды) и другие неорганические компоненты (кальций, калий, натрий, магний, фосфаты, хлориды, карбонаты), уровень которых зависит от состояния полости рта.

Компоненты слюны защищают мягкие и твёрдые ткани полости рта. Муцины защищают ткани от повреждения и придают термоустойчивость, предотвращают адгезию бактерий на слизистой оболочке и зубах, стабилизируют мицеллы слюны. В ротовой жидкости активны более 100 ферментов. Высоко значимые гликозидазы – α -амилаза паротидной железы и лизоцим. Цитолиз при паротите ведёт к росту активности α -амилазы в крови и моче. При пародонтите, гингивите в слюне увеличивается активность щелочной и кислой фосфатаз слюнных желёз (и поступающих из бактерий, лейкоцитов, эпителия).

Ионы Ca^{2+} и гидрофосфаты мицелл слюны способствуют минерализации эмали. Дестабилизация КОС и снижение pH превращает слюну из минерализующей жидкости в деминерализующую, снижает устойчивость к кариесу. Пероксидаза слюны катализирует окисление роданидов (тиоцианатов) в присутствии H_2O_2 до ионов OSCN^- и гипотиоцианата (HOSCN), антибактериальная активность которых выше, чем у пероксида водорода. Максимум окисления роданидов приходится на pH=5-6, когда велика опасность деминерализации тканей зуба. При воспалениях пародонта прогрессируют окислительные процессы, особенно перекисное окисление липидов и белков. В ограничении проявлений гингивита, периодонтита и других заболеваний пародонта важны антиоксиданты, в том числе неферментативные - витамины С, Е и др. Вместе с тем, аскорбат является фактором созревания коллагена, постоянно обновляющегося в связочном аппарате и других тканях пародонта. В ряде случаев исследование химического состава слюны используют для диагностики в клинике внутренних болезней.

Цель

1. Получить комплексные представления о слюне и десневой жидкости, их значении в поддержании гомеостаза полости рта и влиянии на ткани зуба в норме и при патологии для понимания природы заболеваний полости рта.
2. Оценить основные параметры слюны, значение органических и неорганических ингредиентов на примере белков (муцинов), ферментов (α -амилазы, щелочной фосфатазы), компонентов минеральной фазы (кальция, фосфатов, хлоридов, роданидов).
3. Научиться определять обеспеченность организма витамином С, известным в качестве фактора поддержания здоровья тканей пародонта.

Вопросы для самоподготовки

1. Ротовая жидкость. Происхождение. Основные параметры (объем, скорость образования, показатель pH и др.). Разнообразие химического состава. Биологические функции.
2. Состав слюны из протоков слюнных желез: основные неорганические и органические компоненты. Нестимулированная и стимулированная слюна. Основные отличия. Причины и факторы стимуляции.

3. Организация слюны. Мицеллы, их виды и строение, роль белков-муцинов, ионов кальция и фосфатов в построении мицелл.
4. Кислотно-основное состояние слюны, химические и физиологические механизмы его обеспечения, значение зубной эмали и буферных систем.
5. Значение ротовой жидкости в процессах минерализации, де- и реминерализации зубной эмали. Механизмы и условия поступления минеральных веществ из ротовой жидкости в эмаль.
6. Белки ротовой жидкости, происхождение, особенности строения, разнообразие, полифункциональность. Белки неспецифической защиты полости рта. Специфические белки слюны.
7. Ферменты слюны, их происхождение, разнообразие, роль в полости рта.
8. Иммуноглобулины ротовой жидкости: происхождение, строение, функции. Секреторный иммуноглобулин А: происхождение секреторного компонента, транзитоз, значение.
9. Пелликула как поверхностное образование на эмали: происхождение, химический состав. Преобразования белков ротовой жидкости и механизмы их участия в построении пелликулы.
10. Происхождение, органические и минеральные компоненты зубной бляшки. Динамика микрофлоры при созревании бляшки, биохимические особенности кариесогенных микробов, синтез углеводных полимеров матрикса бляшки из простых сахаров, использование продуктов метаболизма сахаров в жизнедеятельности микробов (муреин). Роль слюны в минерализации бляшки, состав и динамика созревания минеральных компонентов, зубной камень.
11. Десневая жидкость: образование, роль в полости рта, особенности формирования химического и клеточного состава, белки и ферменты.
12. Пародонт как комплекс тканей, особенности функционирования коллагена в связочном аппарате и других тканях пародонта. Значение десневых карманов и зубного камня в развитии заболеваний пародонта. Биохимические особенности пародонтопатогенных бактерий.
13. Нейтрофилы десневой жидкости в механизмах антимикробной защиты (O_2 -зависимых и независимых) в тканях полости рта. Окислительные механизмы в поддержании здоровья пародонта. Перекисное окисление липидов, синдром перекисидации и его причины.
14. Строение и роль витаминов–антиоксидантов в поддержании здоровья пародонта, их участие в метаболических реакциях. Особенности системы антиоксидантной защиты тканей пародонта.

Задания для самоподготовки

1. По приведённой информации подобрать для каждой функции один или несколько белков/ферментов ротовой жидкости.

Функция	Белок / фермент
1. Переваривание	А. Муцины
2. Минерализация	Б. Амилаза
3. Защита тканей	В. Белки, богатые пролином
4. Защита от кариеса	Г. Лизоцим
5. Смазка и обволакивание	Д. Статерины
6. Антибактериальная	Е. Лактоферрин
7. Антигрибковая	Ж. Пероксидазы
8. Антивирусная	З. Гистатины
9. Стабилизация мицелл	И. Цистатины
10. Очищающая	К. Фосфатазы
11. Антиоксидантная	Л. Карбоангидраза
12. Поддержание кислотно-основного состояния	М. Секреторный иммуноглобулин А

2. Представить в виде таблицы сравнительный анализ органических компонентов ротовой и десневой жидкостей.
3. Представить в виде таблицы сравнительный анализ минерального состава ротовой и десневой жидкостей.

Лабораторная работа 1

Определение рН ротовой жидкости

Актуальность

Смешанная слюна человека имеет реакцию среды, близкую к нейтральной. В механизмах обеспечения постоянства рН принимают участие буферные системы слюны – карбонатная, фосфатная, белковая. От показателя кислотно-основной реакции зависит состав, коллоидная устойчивость и минерализующий потенциал мицелл слюны, определяющий процессы минерализации, реминерализации зубной эмали и её кариесорезистентность. На кислотность слюны влияют гигиеническое состояние полости рта и характер пищи.

Материал для исследования

1) Слюна нестимулированная (собирают после ополаскивания рта водой), 2) слюна стимулированная (в качестве стимулятора используют полоскание рта раствором сахарозы с добавлением сока лимона/лимонной кислоты).

Оборудование

1) рН-метр, 2) синяя и красная лакмусовая индикаторная бумага, 3) универсальные индикаторные тест-полоски и эталонная шкала рН.

С ПОМОЩЬЮ ИНДИКАТОРНОЙ БУМАГИ

Принцип

Определение рН слюны основано на изменении окраски индикаторов при взаимодействии с компонентами ротовой жидкости.

Проведение анализа

Предметное стекло кладут на лист белой бумаги, на стекло помещают образцы лакмусовой бумаги, на каждый наносят по 3 капли слюны, определяют её реакцию:

- 1) синяя лакмусовая бумага краснеет, красная не изменяет цвет – кислая реакция слюны,
- 2) красная бумага синееет, синяя не изменяет цвет – щелочная реакция слюны,
- 3) обе бумаги не изменяют цвет – нейтральная реакция слюны.

В работе можно использовать и другие виды индикаторных бумаг (с учётом диапазона рН).

С ПОМОЩЬЮ ЭКСПРЕСС-ТЕСТОВ

Принцип

Определение рН слюны основано на изменении окраски индикаторной зоны тест-полоски при взаимодействии с элементами ротовой жидкости.

Проведение анализа

Предметное стекло кладут на лист белой бумаги, на стекло помещают экспресс-полоску, в области её индикаторной зоны наносят 2 капли слюны и, выждав указанное в инструкции время, сравнивают окраску индикаторной зоны с контрольной (эталонной) шкалой рН, нанесённой на упаковку экспресс-теста.

С ПОМОЩЬЮ РН-МЕТРА

Принцип

Определение рН слюны основано на ионных процессах, происходящих на измерительном электроде рН-метра.

Проведение анализа

Стимулированную и нестимулированную слюну собирают в отдельные флаконы и измеряют значение рН этих жидкостей согласно инструкции, прилагаемой к прибору.

Нормальные величины

Значение рН смешанной слюны 6,4-7,3.

Практическое значение работы

Сдвиг pH смешанной слюны в кислую сторону нарушает процессы минерализации зубной эмали, что способствует развитию кариеса. Сдвиг pH смешанной слюны в щелочную сторону нарушает коллоидоустойчивость мицелл слюны, что способствует осаждению фосфата кальция из состава мицелл слюны и формированию зубных камней.

Оформление работы

Сравнивают полученные результаты (стимулированная и нестимулированная слюна) с нормальными значениями, делают вывод о наличии отклонений и клиническом значении исследуемого показателя.

Объект исследования	Показатель pH		
	Индикаторная бумага	Экспресс- тест	pH-метр
Нестимулированная слюна			
Стимулированная слюна			

Лабораторная работа 2

Определение концентрации общего кальция в ротовой жидкости

Кальций является ведущим минеральным компонентом при формировании зубов и костей, участвует в обмене веществ и секреторных процессах клеток слюнных желёз, влияет на проницаемость их мембран, является посредником регуляторного действия гормонов. В составе слюны кальций образует пересыщенный раствор, что важно для обеспечения процессов минерализации. Находясь в мицеллах слюны в качестве противоиона, Ca^{2+} стабилизирует заряд ионов HPO_4^{2-} (гидрофосфата), способствует поддержанию контакта мицелл с белками и оптимизации включения минеральных компонентов в эмаль.

Принцип метода

Титрационный метод основан на способности кальция к образованию с индикатором хромоген чёрный ЕТ-00 соединения розово-фиолетового цвета, при титровании такого окрашенного раствора трилоном Б (двузамещённая натриевая соль этилендиаминотетрауксусной кислоты, образующая прочные комплексы с ионами кальция) окраска меняется на сине-розовую в эквивалентной точке, соответствующей связыванию трилоном Б всех ионов Ca^{2+} в растворе.

Необходимые реактивы

1) аммиачный буферный раствор, 2) спиртовой раствор индикатора хромогена чёрного, 3) 0,002 моль/л раствор трилона Б.

Материал для исследования

Смешанная слюна.

Ход проведения анализа

В колбу для титрования вносят 25 мл H_2O , 1 мл аммиачного буферного раствора, 1 мл исследуемой слюны и 2 капли хромогена чёрного ЕТ-00. Раствор приобретает розово-фиолетовый цвет. Титруют 0,002 М раствором трилона Б до сине-розовой окраски. По объёму раствора трилона Б, пошедшего на титрование, рассчитывают содержание общего кальция в слюне.

Расчёт

Содержание кальция (в мг%) в слюне рассчитывают по формуле

$$X \text{ (мг\%)} = \frac{0,002 \cdot 40,8 \cdot 100 \cdot V_T}{V_C}$$

где: 0,002 – молярность раствора трилона Б; 40,8 – молекулярный вес кальция; 100 – коэффициент для пересчета в мг%; V_T – объём трилона Б, израсходованный на титрование; V_C – объём слюны, взятый для анализа.

Для пересчёта показателя концентрации кальция в ммоль/л (единицы СИ) используют коэффициент 0,245.

$$C \text{ (ммоль/л)} = X \cdot 0,245$$

Нормальные величины

Ротовая жидкость 1,1–1,3 ммоль/л (4–5 мг%).

Практическое значение работы

Высокая концентрация кальция в ротовой жидкости обеспечивает эффективное поступление минеральных компонентов в ткани зуба, препятствует растворению эмали и возникновению кариозного процесса, способствует профилактике и лечению поражений эмали при флюорозе и начальном кариесе.

Оформление работы

Указывают принцип метода, регистрируют полученные данные, делают расчёты и выводы о наличии или отсутствии патологических отклонений, сравнивают полученные результаты с нормальным содержанием общего кальция в сыворотке крови.

Лабораторная работа 3

Определение концентрации общего неорганического фосфата в ротовой жидкости

Общий фосфат в слюне представлен, главным образом, пересыщенным раствором неорганического фосфата. Содержание общего фосфата в слюне в 2–10 раз выше, чем в сыворотке крови, из него 70–95 % приходится на ионы HPO_4^{2-} и H_2PO_4^- , образующие буферную систему. Потенциал главных мицелл слюны определяют ионы HPO_4^{2-} , которые при закислении среды аккумулируют протоны, превращаясь в ионы H_2PO_4^- , до исчерпания буферной ёмкости фосфатной системы. При этом минерализующая функция слюны снижается вплоть до инверсии и появления деминерализующих свойств, когда избыточная кислотная нагрузка компенсируется уже за счёт гидроксиапатитов эмали: сначала ослабление (обмен Ca^{2+} на ионы H^+) кристаллов, затем их разрушение и растворение. Около 5 % фосфатов связано с белками (связанного фосфата 2,2–6,5 ммоль/л). Белковосвязанный фосфат участвует в регуляции гомеостаза полости рта, поддержании структурно-функциональных свойств мицелл слюны. Одним из механизмов утилизации неорганического фосфата в полости рта является его поглощение микрофлорой для обеспечения гликолиза и процессов биосинтеза.

Принцип метода

Метод Больца и Льюка основан на способности фосфатов к образованию в кислой среде в присутствии молибдата натрия синего гетерополициклического соединения. Метод прост и на 30–50 % чувствительнее других модификаций.

Необходимые реактивы

1) Стандартный раствор – содержит 0,05 мг фосфора в 100 мл раствора (0,2197 г KH_2PO_4 растворяют в 1,0 л H_2O), 2) 7 % раствор ТХУ, 3) 2,5 % раствор молибдата натрия в 1 N H_2SO_4 , 4) 0,15 % раствор гидразин сульфата, 5) рабочий раствор (перед работой смешивают растворы 3 и 4 в соотношении 2,5:1). Калибровочный график на фосфор лаборанты готовят заранее.

Материал для исследования

Нестимулированная смешанная слюна.

Проведение анализа

Для получения безбелкового фильтрата в центрифужную пробирку вносят 0,2 мл слюны и добавляют 1,8 мл 7 % ТХУ с целью осаждения белков. Белковый осадок отделяют центрифугированием в течение 10 минут при 3000 об/мин. Для оценки содержания фосфатов к 2 мл надосадочной жидкости добавляют 2 мл рабочего раствора (содержащего растворы молибдата натрия и гидразин сульфата), пробу перемешивают и ставят на 10 мин в кипящую водяную баню. При нагревании в пробирке развивается голубое окрашивание. Интенсивность

окраски измеряют при длине волны 650 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм против рабочего раствора (можно использовать дистиллированную воду).

Расчёт

Расчёты производят по прилагаемому калибровочному графику, выражая результаты в ммоль/л.

Нормальные величины

Ротовая жидкость до 7,0 ммоль/л.

Практическое значение

Снижение концентрации общего неорганического фосфата в ротовой жидкости способствует формированию и прогрессированию кариесогенной ситуации, развитию поражений эмали при флюорозе. Высокая концентрация фосфатов и кальция в слюне обеспечивает поступление минеральных компонентов в ткани зуба, препятствуя растворению эмали, что используют при назначении минерализующих растворов для профилактики и лечения начальных форм кариеса и флюороза, когда сохранена белковая матрица эмали.

Оформление работы

Указывают принцип метода, регистрируют данные, делают расчёты, сравнивают полученный результат с нормальными значениями концентрации общих фосфатов в слюне, сопоставляют с содержанием общего кальция в слюне, делают выводы о наличии/отсутствии патологических отклонений, указывают клиническое значение.

Лабораторная работа 4

Определение концентрации хлоридов в слюне и плазме крови

Хлор в организме находится в основном в ионизированной форме. Основную биологическую роль хлорид-ионы играют как главные внеклеточные анионы. Анионы хлора являются наиболее важными осмотически активными компонентами плазмы крови, лимфы, ротовой и спинномозговой жидкости. В ротовую жидкость ионы поступают из плазмы крови.

Необходимые реактивы

1) 0,45 % раствор $ZnSO_4$, 2) 0,1 М раствор $NaOH$, 3) 2 % раствор K_2CrO_4 , 4) раствор $AgNO_3$, 5) 100 ммоль/л стандартный раствор $NaCl$, 6) раствор хлораниловокислой ртути, 7) эфир.

Материалы для исследования

1) смешанная слюна, 2) плазма крови.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ХЛОРИДОВ В СЛЮНЕ ТИТРАЦИОННЫМ АРГЕНТОМЕТРИЧЕСКИМ ОСАДОЧНЫМ МЕТОДОМ ЛЕВИНСОНА

Принцип метода

Ионы Ag^+ способны к образованию нерастворимых солей с ионами Cl^- . Титрование хлорид-ионов азотнокислым серебром проводят в присутствии индикатора K_2CrO_4 . Количество осаждающего вещества ($AgNO_3$) эквивалентно содержанию ионов Cl^- , и при достижении эквивалентной точки титрования избыток ионов Ag^+ образует с индикатором соединение кирпично-красного цвета (Ag_2CrO_4).

Проведение анализа

Для осаждения белков слюны в двух пробирках готовят смесь из 5 мл 0,45 % раствора $ZnSO_4$ и 1 мл 0,1 М раствора $NaOH$. Затем в 1-ю пробирку (опыт) вносят 0,1 мл слюны, во 2-ю (контроль) – 0,1 мл дистиллированной воды. Пробирки кипятят в течение 3 минут над пламенем спиртовки. Затем содержимое пробирок фильтруют через воронки с ватным фильтром в колбочки для титрования. Осадок на ватном фильтре промывают два раза водой (по 3 мл). К фильтрату приливают 2 капли 2 % раствора K_2CrO_4 и для осаждения ионов хлора титруют раствором $AgNO_3$ до изменения жёлтого цвета раствора на кирпично-красный.

Расчёт

Содержание хлоридов в слюне в мг% рассчитывают по формуле

$$C \text{ (мг\%)} = (V_{\text{опыт}} - V_{\text{контр}}) \cdot 0,355 \cdot 1000 ,$$

где: $V_{\text{опыт}}$ – объём AgNO_3 , израсходованный на титрование опытного раствора; $V_{\text{контр}}$ – объём AgNO_3 , пошедший на титрование контрольного раствора; 0,355 – коэффициент для пересчёта результата в мг хлора на 0,1 мл слюны; 1000 – коэффициент для пересчёта содержания хлора в мг на 100 мл (мг%).

Для пересчёта показателя из мг% в ммоль/л (единицы СИ) используют коэффициент 0,282

$$C \text{ (ммоль/л)} = C \text{ (мг\%)} \cdot 0,282$$

Нормальные величины

Ротовая жидкость 20–40 ммоль/л.

Практическое значение

Ионы Cl^- участвуют в поддержании заряда мицелл и коллоидоустойчивости слюны. Избыток хлорид-ионов снижает коллоидную устойчивость ротовой жидкости и минерализующую способность мицелл в отношении зубной эмали.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ХЛОРИДОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Принцип метода

Хлорид-ионы освобождают из хлораниловокислой ртути (II) хлораниловую кислоту, содержание которой определяется фотометрически, количество хлораниловой кислоты пропорционально концентрации хлорид-ионов в пробе.

Проведение анализа

	Опыт, мкл	Контроль, мл
Плазма крови	20	-
Стандартный раствор NaCl	-	20
Раствор хлораниловокислой ртути	2000	2000
	1 мин энергично встряхивают и инкубируют 10 минут	
Эфир	2 капли	2 капли
	Перемешивают пробы и фильтруют через смоченные водой фильтры	
Колориметрируют обе пробы против воды при длине волны 530 нм (зелёный светофильтр) в кювете с толщиной слоя 10 мм.		

Расчёт

Количество хлорид-ионов в плазме крови рассчитывают по формуле

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

где: $E_{\text{оп}}$ и $E_{\text{ст}}$ – оптическая плотность опытной и стандартной проб, $C_{\text{ст}}$ – концентрация хлоридов в стандартном растворе (100 ммоль/л).

Нормальные величины

Плазма крови 94-110 ммоль/л

Рассчитывают процентное соотношение концентрации хлорид-ионов (К) в ротовой жидкости и концентрации хлорид-ионов в плазме крови.

$$K (\%) = (C_{\text{рж}} / C_{\text{пл}}) \cdot 100 \% ,$$

где: $C_{РЖ}$ – концентрации хлоридов в ротовой жидкости (моль/л),

$C_{ПЛ}$ – концентрация хлоридов в плазме крови (ммоль/л).

Практическое значение

Ионы Cl^- являются основными внеклеточными анионами, присутствуют во всех жидкостях организма. *Гиперхлоремия* наблюдается при обезвоживании, вызванном недостаточным поступлением жидкости, при повышенном поступлении хлорида натрия, декомпенсации сердца, метаболическом ацидозе и респираторном алкалозе, снижении экскреции хлорид-ионов с мочой при нефритах, отравлении салицилатами, приёме глюкокортикоидов. *Гипохлоремия* встречается чаще и возникает при недостаточном поступлении хлоридов и избыточной потере через желудочно-кишечный тракт при заболеваниях, сопровождающихся неукротимой рвотой и поносом, при стенозе привратника, длительном потоотделении, почечном и сахарном диабете, сморщенной почке, в результате перераспределения и задержки хлоридов в повреждённых тканях при хронических воспалительных процессах, абсцессах, некрозах.

Оформление работы

Указывают принцип метода, регистрируют данные, делают расчёты, сравнивают полученные результаты с нормальными значениями показателя хлоридов в ротовой жидкости и плазме крови, делают выводы о наличии/отсутствии отклонений.

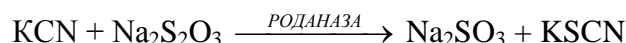
Задание

Провести сравнительную оценку полученных на лабораторных работах показателей содержания хлоридов, фосфатов, ионов кальция в крови с аналогичными показателями в слюне с целью охарактеризовать влияние минерального обмена организма на минеральный обмен в слюне. Предположить и обосновать пути и возможности гормональной регуляции минерального обмена слюны.

Лабораторная работа 5

Обнаружение роданидов в ротовой жидкости

В ротовой жидкости содержатся роданиды (тиоцианаты), являющиеся продуктом сульфирования цианидов (солей синильной кислоты) тиосульфатом натрия с помощью роданазы:



Роданиды активируют пероксидазы слюны, участвующие в метаболизме пероксидов, оказывающие защитное действие. В гранулоцитах, поступающих в полость рта с жидкостью десневой борозды, локализован фермент лактопероксидаза, который окисляет имеющийся в слюне роданид с помощью перекиси водорода в бактерицидный гипотиоционат:



Содержание роданидов в слюне зависит от контакта человека с табачным дымом. В слюне курильщиков их концентрация значительно больше по сравнению с таковой у некурящих. Высокие концентрации роданидов в ротовой жидкости вызывают токсические эффекты в пародонте.

Принцип метода

Роданиды в слюне обнаруживают по появлению красного окрашивания при добавлении к слюне хлорного железа. Реакция обусловлена образованием роданистой соли трехвалентного железа в результате взаимодействия ионов Fe^{3+} и SCN^- и образованием различных комплексов, имеющих состав от $Fe(H_2O)_5(NCS)^{2+}$ до $Fe(NCS)_6^{3-}$. Некоторые органические соединения (например, соли лимонной и уксусной кислот) препятствуют образованию окраски.

Необходимые реактивы

1) 0,01 % раствор хлорного железа, 2) 2 % раствор соляной кислоты.

Материал для исследования

Слюна некурящего человека и курильщика.

Проведение анализа

Готовят две пробы: опытную (слюна курильщика) и контрольную (слюна некурящего человека). В каждую пробирку к 10 каплям слюны добавляют по 2 капли 2 % раствора соляной кислоты и по 2 капли раствора хлорного железа (FeCl₃). В результате реакции появляется роданид железа и развивается красное окрашивание разной интенсивности в зависимости от концентрации ионов роданида.

Нормальные величины

Ротовая жидкость 0,5-1,2 ммоль/л
(визуально окраска не дифференцируется).

Практическое значение

Основным путём поступления лейкоцитов в полость рта является десневая бороздка и её жидкость. В местах повреждения слизистой оболочки полости рта происходит дополнительная миграция гранулоцитов крови, которые принимают участие в реакциях защиты. Один из механизмов защиты основан на способности гранулоцитов к продукции гипотиоцианата. Гипотиоцианат чрезвычайно бактерициден и совместно с H₂O₂ и другими активными формами кислорода действует на микрофлору в полости рта (в том числе кариесогенную). Однако высокие концентрации роданидов токсичны для пародонта и способствуют развитию воспаления. Содержание роданидов (тиоцианатов) повышено в слюне курильщиков (в 2-10 раз выше, чем у некурящих), что связано с поступлением в организм синильной кислоты табачного дыма. Чем выше концентрация тиоцианатов в слюне, тем более заметной становится окраска.

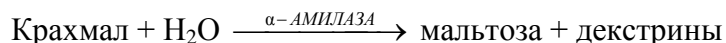
Оформление работы

Указывают принцип метода, фиксируют результаты, сравнивают полученные у разных людей данные с нормальными величинами, делают вывод о наличии/отсутствии патологических отклонений и значении показателя.

Лабораторная работа 6

Определение активности α-амилазы в слюне, плазме крови и моче

α-Амилаза (диастаза, 1,4-α-D-глюкангидролаза, КФ 3.2.1.1) катализирует гидролиз α-1,4-гликозидных связей крахмала до декстринов и мальтозы:



α-Амилаза тканеспецифична, её продуцируют слюнные железы и поджелудочная железа. Главная роль α-амилазы в организме – пищеварительная, поэтому фермент секретируется экзокринно, поступая, соответственно, в ротовую полость и просвет 12-перстной кишки. До 70 % фермента в полость рта секретируют околоушные железы. В результате естественного старения и отмирания клеток слюнных и поджелудочной желез молекулы фермента попадают в кровь, поэтому в плазме крови всегда в небольшом количестве содержится α-амилаза двух изоферментных типов: слюнной S-тип (около 70 %) и панкреатический P-тип (около 30 %). Фермент амилаза имеет относительно низкую молекулярную массу (около 48000 D), в связи с чем фильтруется в почечных клубочках и присутствует в моче. Соотношение изоферментов в моче иное, чем в крови: P-тип – 70 %, S-тип – до 30 %. Хлориды и иодиды повышают активность фермента. При нарушении целостности железистых клеток, вырабатывающих α-амилазу, развитию процессов цитолиза сопутствует повышение концентрации и активности фермента в плазме крови и моче, что используют с целью диагностики заболеваний слюнных и поджелудочной желез. В моче фермент традиционно называют «диастаза».

*ЭНЗИМАТИЧЕСКИЙ КИНЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД,
ОПТИМИЗИРОВАННЫЙ ДЛЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ*

Принцип метода

α -Амилаза катализирует реакцию гидролитического преобразования специфического углеводного субстрата, протекающую с отщеплением от олигосахарида 2-хлор-4-нитрофенола:



Скорость образования 2-хлор-4-нитрофенола пропорциональна активности фермента и определяется фотометрически.

Необходимые реактивы

Стандартный набор: 1) буферный раствор (0,05 М MFS-буфер (рН 6,0) и 5 ммоль/л раствор хлористого кальция), 2) лиофилизированный субстрат. Для приготовления рабочего реагента, содержащего субстрат в концентрации 2,5 ммоль/л, содержимое флакона с субстратом растворяют в буфере, аккуратно перемешивая, и оставляют на 3-5 минут для стабилизации.

Материал для исследования

1) ротовая жидкость (разведение 10-50 раз), 2) сыворотка крови, 3) моча.

Проведение анализа

В кювете фотометра с длиной оптического пути 1 см смешивают рабочий реагент и исследуемую жидкость в соотношении 50:1 (рекомендуется использовать 3,5 мл рабочего реагента и 70 мкл сыворотки крови или разведённой слюны) и через 10 с измеряют оптическую плотность раствора (E_0) при длине волны 405 нм против воздуха. Измерение повторяют точно (по секундомеру) через 1 мин (E_1), 2 мин (E_2), 3 мин (E_3), не вынимая кювету из прибора.

Расчёт

Считают среднее значение изменения оптической плотности в минуту $\Delta E/\text{мин}$.

$$\Delta E/\text{мин} = [(E_1 - E_0) + (E_2 - E_1) + (E_3 - E_2)] : 3$$

Расчёт активности α -амилазы производят по одной из формул (в зависимости от того, в каких единицах необходимо представить активность фермента):

$$\text{Активность } \alpha\text{-амилазы [Ед/л]} = \Delta E/\text{мин} \cdot 3806$$

$$\text{Активность } \alpha\text{-амилазы [нмоль/(с} \cdot \text{л)]} = \Delta E/\text{мин} \cdot 63446$$

Нормальные величины

Значения активности α -амилазы в сыворотке зависят от температуры анализа:

при 25 °С - до 120 Ед/л или до 2000 нмоль/(с · л)

при 30 °С - до 160 Ед/л или до 2670 нмоль/(с · л)

при 37 °С - до 220 Ед/л или до 3670 нмоль/(с · л)

КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗЫ

Принцип метода

α -Амилаза катализирует гидролиз нерастворимого цветного крахмального субстрата с образованием синего, растворимого в воде красителя. Количество освобождённого красителя пропорционально каталитической активности энзима.

Необходимые реактивы

1) фосфатный буфер рН=7,0, 2) крахмальный субстрат, 3) 9 ммоль/л раствор NaCl, 4) осаждающий раствор (1,85 ммоль/л раствор MgSO₄ и 2 ммоль/л раствор сульфосалициловой кислоты).

Материал для исследования

Свежая моча, сыворотка крови.

Проведение анализа

Готовят две опытных пробы (для свежей мочи и сыворотки крови), добавляя реагенты согласно приведенной ниже таблице, далее обе пробы обрабатывают одновременно.

Реагенты, мкл	Опыт 1	Опыт 2
Крахмальный субстрат	1000	1000
	Инкубируют при 37°C 5 мин	
Сыворотка крови	100	-
Моча	-	50
	Перемешивают, инкубируют при 37°C точно 15 мин	

В обе пробирки добавляют по 2,0 мл осаждающего раствора, тщательно перемешивают, через 15 мин уравнивают и центрифугируют 5 мин при 3000 об/мин (или фильтруют через слой ваты). Измеряют оптическую плотность опытных проб против воды при длине волны 590 нм (зелёный светофильтр) в кювете с длиной оптического пути 10 мм.

Нормальные величины

Сыворотка крови 140-350 Е/л,
Моча 1000-2000 Е/л.

Расчёт

Активность α -амилазы в сыворотке и моче находят по приведённой ниже калибровочной таблице, исходя из полученной оптической плотности. Найденную по таблице каталитическую активность α -амилазы мочи необходимо умножить на 2. Если проба имеет высокую активность фермента, её разбавляют физиологическим раствором, снова проводят процедуру определения, полученный результат умножают на разведение.

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

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗЫ МОЧИ (МЕТОД БЮХНЕРА)

Принцип метода

Основан на определении времени, необходимого для полного расщепления 2 мг крахмала амилазой исследуемой порции мочи.

Необходимые реактивы

1) раствор Люголя (0,1 % раствор йода в 0,2 % растворе КJ), 2) 0,1 % раствор крахмала, 3) физиологический раствор (0,85 % раствор NaCl).

Проведение анализа

Отмеривают в пробирку 2,0 мл раствора крахмала, 1,0 мл физиологического раствора и помещают на 2 минуты в водяную баню при 37 °С. После прогревания в пробирку добавляют 0,5 мл мочи, перемешивают и отмечают время начала реакции. На предметные стёкла в 5-6 местах наносят по капле раствора йода. Через каждые 3 минуты берут из пробирки исследуемую смесь и смешивают с очередной каплей йода. Инкубацию продолжают до тех пор, пока вместо сине-фиолетового окрашивания не появится жёлтое, в этот момент гидролиз 2 мг крахмала можно считать законченным.

Расчёт

Активность α -амилазы рассчитывают по формуле:

$$\text{Активность амилазы [усл.ед.]} = \frac{15 \times 1}{T \times 0,5},$$

где: 15 – время, необходимое для расщепления 2 мг крахмала (мин), 1 – условно принятая единица активности амилазы, при которой расщепляется 2 мг крахмала за 15 мин, T – фактическое время реакции (мин), 0,5 – количество мочи в реакционной смеси (мл).

Нормальные величины

Моча 1–2 усл. ед. (метод Бюхнера)

Практическое значение работы

Повышение активности фермента α -амилазы происходит, главным образом, при воспалении и дегенеративных изменениях поджелудочной и слюнных желёз (например, при паротите - воспалении колоушной железы). Особенно повышение выражено при остром некрозе поджелудочной железы, остром панкреатите, когда активность фермента в крови и моче возрастает в 10-30 раз. В детском возрасте повышение наблюдается при эпидемическом паротите, что указывает на поражение вирусом паротита не только слюнных желёз, но и поджелудочной железы, иногда поражает поджелудочную железу вирус гриппа. Возрастание активности α -амилазы выявляется при диабетическом кетоацидозе, беременности, почечной недостаточности, кишечной непроходимости, заболеваниях желчных путей, некоторых опухолях легких и яичников.

Оформление работы

Указывают принцип метода, регистрируют результаты, делают расчёты, сравнивают полученные данные с нормальными величинами, формулируют выводы о наличии/отсутствии патологических отклонений с учетом клинического значения определяемого показателя.

Лабораторная работа 7

Определение буферной ёмкости слюны

Буферная ёмкость слюны – способность нейтрализовать кислоты и щёлочи – обычно расценивается как защитный механизм полости рта, функционирующий по принципу саморегуляции. Буферная ёмкость поддерживается бикарбонатной, белковой и фосфатной буферными системами слюны. Бикарбонаты обеспечивают 50-80 % буферных свойств слюны, их концентрация возрастает прямо пропорционально увеличению скорости ее секреции. Белковую систему считают второй по значению, фосфатную – третьей. Кроме буферных систем слюна содержит ряд веществ (мочевина, ксиолин), при гидролизе которых ферментами микрофлоры вырабатывается аммоний (NH_4OH), оказывающий местное защелачивающее действие.

Буферная ёмкость слюны значительно варьирует и зависит от характера питания, времени суток, состояния желудочно-кишечного тракта. С увеличением скорости слюноотделения рН слюны возрастает, поэтому днём значения рН выше, чем ночью. Буферная способность слюны является главным механизмом снижения кислотной нагрузки на поверхность зуба и очень важна в механизмах защиты от кариеса.

Принцип метода

Сила буферных систем определяется их буферной ёмкостью, т.е. количеством молей кислоты или основания, которое необходимо добавить к буферному раствору, чтобы сместить его активную реакцию на единицу. Для слюны наиболее важно определение буферной ёмкости в отношении кислых продуктов, для чего добавляют фиксированный объём раствора соляной кислоты.

Необходимые реактивы

1) 0,005 N раствор HCl, 2) 0,5 % раствор индикатора метилоранж.

Материал для исследования

1) слюна нестимулированная, 2) слюна стимулированная.

Проведение анализа

Оценивают слюноотделение (количество выделяемой слюны в единицу времени) путём сиалометрии. Объём слюны измеряют специальным сиалометром или мерными цилиндрами на 10 мл, откалиброванными с точностью 0,1 мл. При сборе слюны в цилиндры удобно использовать воронки. Слюну собирают натошак или через 1,5-2,0 ч после еды. Сбор слюны проводят в течение 2 мин: а) в состоянии покоя - нестимулированная слюна, б) при стимулировании - стимулированная слюна (сбор производят у разных студентов, в качестве стимулирующего агента используют парафин, лимон или лимонную кислоту). Для получения достоверных результатов процедуру повторяют трижды и вычисляют среднее значение. Проведение сиалометрии совмещают с анализом буферной ёмкости: к 1,0 мл слюны постепенно добавляют 3,0 мл 0,005 N раствора HCl и более.

Расчёт

Вычисляют скорость слюноотделения (мл/мин) и буферную ёмкость 1 мл слюны.

Нормальные величины

Средняя скорость выделения слюны:

состояние покоя	0,3-0,4 мл/мин (границы колебаний широкие, перекрытие может быть 20-30-кратным);
стимуляция	возрастание скорости (стимуляция парафином увеличивает показатель до 1-2 мл/мин).

Буферная ёмкость слюны:

норма - 5-7,
пограничный уровень - 4-4,5,
низкий уровень - меньше 4.

Практическое значение работы

Особенное значение буферная ёмкость смешанной слюны приобретает при определении риска возникновения кариеса.

Оформление работы

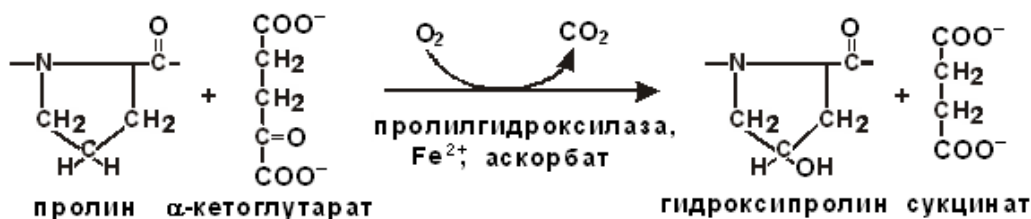
Указывают принцип метода, фиксируют результаты, сравнивают полученные у разных людей данные с нормальными величинами, делают вывод о наличии/отсутствии патологических отклонений, отмечают клиническое значение показателей.

Лабораторная работа 8

Оценка обеспеченности организма витамином С по его содержанию в моче

Аскорбат (витамин С) является водорастворимым витамином, не синтезируется в организме, излишки его выводятся с мочой. При недостатке в пище аскорбата развивается цинга, когда дефект соединительной ткани приводит к ломкости сосудов, кровоточивости дёсен, поражению кожи и деструкции в тканях пародонта (особенно в периодонтальной связке), что сопровождается расшатыванием и выпадением зубов. Витамин С при синтезе коллагена обеспечивает гидроксилирование аминокислотных остатков пролина под действием фермента

пролилгидроксилазы. В условиях дефицита аскорбата вновь синтезированный коллаген получается недогидроксилированным и не способен к образованию полноценных волокон. Витамин С и ионы Fe^{2+} являются кофакторами пролилгидроксилазы; выступая донором H^+ , аскорбат поддерживает восстановленное состояние Fe^{2+} в активном центре фермента, предохраняя его от инактивации.



Наряду с синтезом коллагена витамин С стимулирует синтез гиалуроновой кислоты и хондроитинсульфата, необходимых для формирования матрикса соединительной ткани. Участие витамина С в окислительно-восстановительных реакциях используется в антиоксидантной защите. При развитии воспалительных и инфекционных заболеваний (в том числе тканей полости рта) аскорбат активно тратится для защиты от токсинов и последствий активации перекисного окисления липидов и белков.

Принцип метода

Аскорбиновая кислота, содержащаяся в биологических пробах, восстанавливает 2,6-дихлорфенолиндофенол (ДХФИФ). Концентрацию витамина С определяют по количеству затраченного на титрование красителя. Как только весь витамин в пробе окислится, титруемый раствор приобретает розовую окраску за счёт наличия в кислой среде недиссоциированных молекул ДХФИФ.

Необходимые реактивы

1) 0,1 % раствор ДХФИФ (краска Тильманса), 2) 2 % раствор HCl.

Материал для исследования

Свежая моча.

Проведение анализа

В колбу отмеривают 5 мл мочи и 5 мл дистил. воды, перемешивают, добавляют 2,5 мл 2 % раствора HCl. Титруют краской Тильманса до розоватого цвета, сохраняющегося 30 с. Регистрируют объём краски, пошедший на титрование.

Расчёт

Содержание аскорбиновой кислоты (мг) в суточном объёме мочи рассчитывают по формуле:

$$\text{Содержание аскорбата, мг / сут} = \frac{0,088 \cdot A \cdot B}{B}$$

где: 0,088 – количество витамина С, соответствующее 1 мл 0,088 моль/л раствора ДХФИФ (мг); А – количество краски Тильманса, затраченной на титрование (мл); Б – среднесуточный объём мочи (мужчины 1500 мл, женщины 1200 мл); В – объём мочи, взятый для титрования (мл).

Нормальные величины

Моча 20-30 мг/сут или 113,55-170,33 мкмоль/сут.

Практическое значение

Приведенный метод используют в клинике для диагностики недостаточности витамина С. Определение концентрации витамина С в моче даёт представление об его запасах в организме в целом, так как содержание аскорбиновой кислоты в крови соответствует количеству данного витамина, выделяемому с мочой. Однако при гиповитаминозе содержание аскорбата в моче не всегда понижено, часто оно бывает в норме на фоне недостатка витамина в тканях и органах, что усугубляет гиповитаминоз.

Уровень аскорбата снижается при острых и хронических инфекционных заболеваниях, а также при цинге, что сопровождается поражением периодонта, кровоточивостью дёсен. У здоровых людей введение *per os* 100 мг витамина С быстро приводит к повышению его концентрации и в крови, и в моче. При гиповитаминозе С ткани, испытывающие недостаток в витамине, активно задерживают принятую аскорбиновую кислоту, и ее концентрация в моче не повышается.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА С В РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ

Материал для исследования

Картофель, плоды шиповника, лук, свежая и квашеная капуста, морковь.

Проведение анализа

При выполнении работы используют данные таблицы и заполняют пустые графы.

1. Выбирают объект исследования для экстрагирования витамина С.
2. Взвешивают навеску, измельчают в ступке ножницами или скальпелем, затем тщательно растирают с 5 мл 2 % раствора HCl, постепенно вливая воду. Оставляют на 5 минут для экстрагирования. Полученную вытяжку фильтруют (тип фильтра определяют по таблице) в мерный цилиндр вместимостью 25 мл. Записывают общее количество полученного экстракта (V_1).
3. Отмеривают часть экстракта мерной пробиркой (объем V_2 в таблице), переносят в колбу для титрования. Титруют краской Тильманса до розового цвета, сохраняющегося 30 с. Записывают объем краски, пошедший на титрование.

Исследуемый продукт	Навеска г	H ₂ O для экстракции, мл	Вид фильтра	Общий объём экстракта, V_1	Экстракт (мл) для анализа, V_2	Аскорбат, мг	
						В 100 г продукта	Для суточной потребности
Картофель	5	20	вата		10		
Капуста свежая	5	20	вата		10		
Капуста квашеная	10	20	вата		10		
Морковь	5	15	вата		1 мл и 5 мл H ₂ O		
Лук репчатый	5	20	вата		10		
Плоды шиповника	1	20	бумага		1 мл и 5 мл H ₂ O		

Расчёт

Рассчитывают содержание аскорбата (мг) в 100 г продукта (или на 100 мл)

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

где: 0,088 – количество витамина С, соответствующее 1 мл 0,088 моль/л раствора ДХФИФ (мг); А – количество краски Тильманса, затраченной на титрование (мл); В – количество продукта, взятого для анализа; V_1 – общее количество экстракта (мл); V_2 – объем экстракта, взятый для титрования (мл); 100 – коэффициент пересчета на 100 г (или 100 мл) продукта.

Учитывая концентрацию аскорбиновой кислоты, найденную в каждом растительном объекте, рассчитывают количество продукта, необходимое для удовлетворения суточной потребности в витамине С, результаты заносят в таблицу.

Нормальные величины

Суточная потребность 100–200 мг, при силовых нагрузках – 250 мг.
В 100 г сырого картофеля 1–5 мг.

Оформление работы

Указывают принцип метода, регистрируют результаты анализа, делают расчёты, сравнивают с нормальными величинами, в выводах указывают обеспеченность организма аскорбиновой кислотой и лучшие пищевые источники.

Вопросы для самоконтроля

1. Состав и физико-химические свойства слюны, суточное количество. Виды слюнных желез и их участие в секреции слюны. Основные функции слюны.
2. Смешанная слюна или ротовая жидкость, отличие состава от слюны из протоков слюнных желез. Стимулированная и нестимулированная слюна.
3. Химический состав слюны. Минеральные и органические компоненты. Структурно-функциональная организация слюны, мицеллы и влияющие факторы, роль муцинов в устойчивости мицелл.
4. Роль минеральных элементов (макро- и микроэлементов) слюны в минерализации эмали зуба. Участие в минерализации зубной бляшки и камня.
5. Белки и ферменты слюны. Группы специфических белков, иммуноглобулины (sIgA и др.), лизоцим, их роль. Остаточный азот слюны, происхождение и значение основных компонентов. Роль в защелачивании, образовании камня.
6. Показатели кислотно-основного состояния полости рта, механизмы регуляции. Буферные системы слюны, буферная емкость. Причины нарушений КОС и системы компенсации. Значение сдвига рН в кислую сторону в деминерализации эмали и развитии кариеса.
7. Углеводы пищи и ферменты переваривания в полости рта, конечные продукты. Метаболический взрыв микрофлоры, химизм и последствия. Особенности биохимии кариесогенной и пародонтопатогенной микрофлоры.
8. Десневая жидкость, химический состав, биологическая роль, изменения при образовании карманов. Нейтрофилы десневой жидкости, значение.
9. Анаэробные процессы и гипоксия тканей пародонта, микрофлора полости рта и продукты гликолиза. Активация перекисного окисления липидов и синдром перекисидации в пародонте, последствия. Антиоксидантная защита, роль витаминов и ферментов, механизмы действия.

Тестовые задания

Выбрать один правильный ответ.

1. СПЕЦИФИЧЕСКИМИ БЕЛКАМИ СЛЮНЫ ЯВЛЯЮТСЯ
 - 1) лактоферрины
 - 2) лептины
 - 3) иммуноглобулины А
 - 4) цистатины
 - 5) α -дефензины
2. АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА ГИСТАТИНОВ СЛЮНЫ ОПОСРЕДОВАНЫ НАЛИЧИЕМ НА N-КОНЦЕ МОЛЕКУЛ АМИНОКИСЛОТ
 - 1) АСП, ГЛУ, СЕР
 - 2) ГИС, ЛИЗ, АРГ
 - 3) АСН, ГЛН, АЛА
 - 4) СЕР, ТРЕ, ПРО-ОН
 - 5) ГЛИ, ПРО, ТИР
3. ИНКРЕТОРНЫЙ ФАКТОР СЛЮННЫХ ЖЕЛЁЗ ПАРОТИН-S НЕ МОЖЕТ
 - 1) снижать концентрацию кальция в крови
 - 2) активировать гемопоэз, лейкоцитоз, стимулировать макрофаги

- 3) способствовать росту и обызвествлению зубов (особенно дентина, цемента, периодонтальной связки), костной и хрящевой ткани
- 4) снижать уровень глюкозы в крови (инсулиноподобное действие)
- 5) вызывать гиперплазию и гипертрофию самих слюнных желёз

4. МИКРОФЛОРА ПОЛОСТИ РТА УТИЛИЗИРУЕТ ЛАКТАТ ПУТЁМ ВКЛЮЧЕНИЯ В СОСТАВ

- 1) левана
- 2) декстрана
- 3) мальтодекстрина
- 4) амилопектина
- 5) муреина

5. СЕКРЕТОРНЫЙ КОМПОНЕНТ sIgA РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ ЯВЛЯЕТСЯ БЕЛКОМ

- 1) железистых клеток
- 2) клеток протоков
- 3) плазмы крови
- 4) плазматических клеток
- 5) десневой жидкости

6. ОСНОВНЫМИ МИЦЕЛЛАМИ СЛЮНЫ ЯВЛЯЮТСЯ

- 1) $\{m[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2] n(\text{H}_2\text{PO}_4)^- (\frac{n-x}{2})\text{Ca}^{2+}\}^{x-} \cdot \frac{x}{2}\text{Ca}^{2+}$
- 2) $\{m[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2] n\text{Ca}^{2+} (n-x)(\text{HPO}_4)^{2-}\}^{2x+} \cdot x(\text{HPO}_4)^{2-}$
- 3) $\{m[(\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2)] n(\text{HPO}_4)^{2-} (n-x)\text{Ca}^{2+}\}^{2x-} \cdot x\text{Ca}^{2+}$
- 4) $\{m[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2] n(\text{PO}_4)^{3-} \frac{3}{2}(n-x)\text{Ca}^{2+}\}^{3x-} \cdot \frac{3}{2}x\text{Ca}^{2+}$

7. КЛЮЧЕВЫМИ ИОНАМИ СЛЮНЫ ПРИ РАСЧЁТЕ ПРОИЗВЕДЕНИЯ РАСТВОРИМОСТИ ЯВЛЯЮТСЯ

- 1) Ca^{2+} и HPO_4^{2-}
- 2) Ca^{2+} и H_2PO_4^-
- 3) Na^+ , Cl^- и Ca^{2+}
- 4) Na^+ , K^+ и Ca^{2+}
- 5) HPO_4^{2-} и H_2PO_4^-

8. РЕЗКОЕ СНИЖЕНИЕ НАСЫЩЕНИЯ СЛЮНЫ КОМПОНЕНТАМИ ГАП С ПЕРЕХОДОМ ОТ МИНЕРАЛИЗУЮЩЕГО К ДЕМИНЕРАЛИЗУЮЩЕМУ СОСТОЯНИЮ ПРОИСХОДИТ ПРИ КРИТИЧЕСКОМ ЗНАЧЕНИИ PH

- 1) 6,0-5,8
- 2) 5,5-4,5
- 3) 5,9-5,5
- 4) 6,2-6,0
- 5) 6,4-5,8

9. СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКОВ В ЖИДКОСТИ ДЕСНЕВОЙ БОРОЗДЫ СОСТАВЛЯЕТ

- 1) 60-70 г/л
- 2) 50-65 г/л
- 3) 65-80 г/л
- 4) 50-60 г/л
- 5) 70-75 г/л

10. К ФЕРМЕНТАМ ДЕСНЕВОЙ ЖИДКОСТИ НЕЛЬЗЯ ОТНЕСТИ

- 1) гиалуронидазу
- 2) кислую фосфатазу
- 3) лактатдегидрогеназу
- 4) щелочную фосфатазу
- 5) уреазу

Ситуационные задачи

1. У пациента обильное отложение зубного налета, множественный кариес, плохо отделяется слюна повышенной вязкости. При анализе слюны обнаружено высокое содержание лактата. *Пояснить, какие причины лежат в основе плохого отделения слюны, каким образом зубной налет удерживается на поверхности зуба, почему повышение содержания лактата в слюне способствует развитию кариеса. Указать, для какой патологии характерны данные признаки, при какой болезни не только плохо отделяется слюна, но и снижена секреция слезной жидкости.*
2. В слюне пациента определяется высокая активность АсАТ, АлАТ, кислых протеиназ и щелочной фосфатазы, рН слюны=8,2. *Указать, для какого заболевания характерны данные изменения, и какие факторы, присутствующие в полости рта, предотвращают возникновение данного заболевания. Пояснить, почему в норме в слюне низкая активность протеиназ, и какие ингибиторы протеиназ присутствуют в смешанной слюне. Указать, какие продукты трансаминазных реакций образуют центры кристаллизации на поверхности эмали и показать, как это происходит.*
3. Кальций-связывающий белок слюны протромбин, поддерживающий её свертывающую активность, содержит модифицированные аминокислотные остатки. *Назвать, какие аминокислоты в его составе подвергаются посттрансляционной модификации, привести реакцию, указать фермент и кофермент. Пояснить, каково функциональное назначение модификации, как ионы кальция связываются модифицированными аминокислотами. Назвать белки других тканей организма, для которых характерна такая модификация вышеназванных аминокислот, указать локализацию и функцию этих белков.*

ТЕМА

КРОВЬ, МОЧА И ПОЧКИ. ЖИДКОСТИ ПОЛОСТИ РТА И ПАРОДОНТ (КОНТРОЛЬНОЕ ЗАНЯТИЕ ПО РАЗДЕЛАМ 11 И 12)

Вопросы для самоподготовки

Кровь, моча и почки

1. Понятие общего белка крови, компоненты, входящие в его состав. Физиологические функции белков крови, нормальные показатели концентрации. Причины изменения концентрации общего белка в крови.
2. Белковые фракции сыворотки крови. Характеристика альбуминов, биологическая роль, причины гипо-, гипер- и анальбуминемий. Глобулины и их фракции, основные представители фракций (см. Приложение), биологическая роль.
3. Нормальные показатели белковых фракций, диспротеинемии и парапротеинемии. Причины изменения концентрации белковых фракций в крови. Нормальная протеинограмма. изменение соотношения белковых фракций при остром и хроническом воспалении, заболеваниях печени, почек, опухолях.
4. Характеристика небелковых азотсодержащих компонентов крови (фракции остаточного азота). Роль и метаболизм мочевины, креатина/креатинина, мочевой кислоты. Клинико-

- диагностическое значение определения этих веществ в крови, их нормальные показатели. Причины и последствия гипераммониемий и азотемий. Понятие клиренса.
5. Характеристика ферментов крови (плазмоспецифичные, индикаторные, экскреторные), примеры. Использование ферментов крови для диагностики заболеваний.
 6. Особенности метаболизма и функций эритроцита. Роль гликолиза и пентозофосфатного пути.
 7. Метаболизм железа. Пищевые источники, нормы потребления, транспорт, депонирование и мобилизация, роль трансферрина и ферритина. Клинические и лабораторные признаки недостаточности железа.
 8. Строение молекулы гемоглобина. Строение гема. Нормальные и патологические формы гемоглобина. Механизм регуляции сродства гемоглобина к кислороду (роль 2,3-дифосфоглицерата, эффект Бора и кооперативный эффект).
 9. Реакции синтеза гема и гемоглобина. Регуляция процессов синтеза. Характеристика нарушений обмена гемоглобина (порфирии, талассемии, гемоглобинозы).
 10. Реакции распада гема, образования билирубина и билирубинглиукуронида, локализация. Основные этапы превращения желчных пигментов в организме. Пути выведения билирубина и желчных пигментов.
 11. Нарушения обмена желчных пигментов. Лабораторные критерии различных видов желтухи (надпеченочной, печеночной, подпеченочной).
 12. Дыхательная функция крови. Механизмы транспорта кислорода и углекислого газа. Способы регуляции.
 13. Характеристика показателей кислотно-основного состояния (КОС). Химические и физиологические механизмы регуляции кислотно-основного состояния в организме. Взаимосвязь транспорта кислорода и углекислого газа с механизмами поддержания кислотно-основного состояния.
 14. Роль почек в регуляции кислотно-основного состояния: реабсорбция бикарбонатов, ацидогенез, аммионогенез.
 15. Нарушения кислотно-основного состояния, его причины, изменение показателей кислотно-основного состояния. Способы компенсации при различных нарушениях КОС.
 16. Характеристика биохимических процессов в нефроне. Противоточно-умножительный механизм образования мочи. Особенности реабсорбции электролитов и воды в различных отделах нефрона. Роль гормонов в процессах реабсорбции.
 17. Вазопрессин (антидиуретический гормон) и минералокортикоиды: химическая природа, место синтеза, регуляция синтеза и секреции, органы-мишени, локализация рецепторов и механизм действия, влияние на обмен веществ и воды. Роль ренин-ангиотензиновой системы. Состояния, обусловленные нарушением действия гормонов. Биохимические механизмы развития почечной гипертензии.
 18. Состав и физико-химические свойства мочи. Нормальные и патологические компоненты мочи, их клинико-диагностическая роль и нормальные значения.

Жидкости полости рта и пародонт

19. Ротовая жидкость: происхождение составных компонентов, основные параметры, химический состав (минералы и органические вещества: безазотистые, белки и фракции остаточного азота), функции. Нестимулированная и стимулированная слюна.
20. Значение ротовой жидкости в минерализации, де- и реминерализации зубной эмали. Организация слюны. Виды мицелл (формулы), строение, ионы кальция и фосфатов в структуре мицелл, роль белков, электролитов. Механизмы и условия поступления минеральных веществ из слюны в эмаль.
21. Кислотно-основное состояние слюны, химические и физиологические механизмы поддержания КОС, значение зубной эмали и буферных систем, критическое значение pH слюны.

22. Белки и ферменты слюны: происхождение, разнообразие, полифункциональность, особенности строения, роль в полости рта. Группы специфических белков слюны, их роль. Значение белков слюны в образовании пелликулы, строение участков контакта с эмалью, преобразования белков и механизмы участия в построении пелликулы.
23. Белки неспецифической защиты полости рта, происхождение и варианты использования. Иммуноглобулины ротовой жидкости: происхождение, строение, функции. Секреторный иммуноглобулин А: транцитоз, происхождение секреторного компонента, значение.
24. Происхождение зубного налёта, роль белков слюны, простых сахаров и микрофлоры в его формировании. Органический и минеральный состав.
25. «Метаболический взрыв», использование продуктов метаболизма сахарозы микрофлорой зубного налёта в своей жизнедеятельности (гликогенopodobные полисахариды, муреин), синтезе гликановых полимеров матрикса бляшки (декстраны, леваны), пируват-форматлиаза. Биохимия кариесогенных микробов.
26. Десневая жидкость: образование, значение для тканей полости рта, химические компоненты, клеточный состав, белки, ферменты. Нейтрофилы десневой жидкости в механизмах антимикробной защиты тканей полости рта.
27. Пародонт как комплекс тканей, коллаген связочного аппарата и других тканей пародонта. Роль десневых карманов и зубного камня в развитии заболеваний пародонта. Биохимия пародонтопатогенных бактерий.
28. Поступление нейтрофилов в десневую жидкость и полость рта, биологическое значение. Особенности метаболизма нейтрофила, респираторный взрыв в механизмах защиты от инфекции при воспалительных заболеваниях тканей полости рта.
29. Синдром пероксидации в тканях пародонта, его причины, активация перекисного окисления липидов. Роль витамина С, других витаминов-антиоксидантов в поддержании здоровья пародонта, их строение и участие в реакциях метаболизма. Система антиоксидантной защиты тканей пародонта.

Практическая часть

Определение параметров и компонентов крови, мочи и ротовой жидкости (клинико-диагностическое значение, нормальные показатели):

- определение содержания общего белка и фракции альбуминов,
- разделение белков сыворотки крови методом электрофореза,
- определение активности α -амилазы слюны, плазмы крови, мочи,
- определение общего остаточного азота сыворотки крови,
- определение содержания гемоглобина в цельной крови,
- определение общего билирубина и его фракций в сыворотке крови,
- определение содержания общего кальция в слюне,
- определение содержания неорганического фосфата в слюне,
- определения содержания хлоридов в сыворотке крови, моче, слюне,
- определение буферной ёмкости сыворотки крови и слюны,
- определение относительной плотности и рН мочи,
- определение рН слюны (индикаторы, экспресс-тесты),
- экспресс-диагностика белка, глюкозы, кетоновых тел, желчных пигментов, гемоглобина в моче,
- оценка белка, глюкозы, кетоновых тел в моче,
- обнаружение роданидов в слюне,
- оценка обеспеченности организма витамином С по его содержанию в моче.

ТЕМЫ ДЛЯ ДОКЛАДОВ
БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ В ПОДДЕРЖАНИИ ЗДОРОВЬЯ
ПОЛОСТИ РТА
(курсовая конференция)

1. Клетки тканей зуба, роль в метаболизме и поддержании здоровья зубов.
2. Процессы минерализации и деминерализации разных тканей зуба.
3. Биохимические механизмы деминерализации и реминерализации эмали зуба, участие ротовой жидкости.
4. Структурно-функциональная организация ротовой жидкости (участие органических и неорганических молекул).
5. Спектр белков и ферментов ротовой жидкости.
6. Белки неспецифической и иммунологической защиты тканей полости рта.
7. Витамины и ферменты антиоксидантной защиты тканей полости рта.
8. Биохимическая кариесорезистентность, влияние структуры и функций на кариесорезистентность. Профилактика кариеса.
9. Роль слюны в предотвращении и развитии кариеса и флюороза зубов.
10. Углеводы тканей зуба и влияние углеводов на состояние тканей зуба.
11. Особенности биохимии кариесогенных и пародонтопатогенных микробов.
12. Теории кариеса. Кислотный, нервно-трофический аспекты развития кариеса.
13. Биохимические особенности кариеса различных тканей зуба (начальный, поверхностный, средний, глубокий).
14. Фтор и ткани полости рта. Гипофтороз и флюороз зубов.
15. Десневая жидкость и поддержание гомеостаза в полости рта.
16. Проксиданты (вещества, процессы) и состояние тканей полости рта.
17. Влияние простагландинов и других эйкозаноидов на состояние пародонта.
18. Влияние табачного дыма на ткани зуба и пародонта.
19. Метаболизм этанола и его эффекты на ткани полости рта.
20. Влияние наркотиков на кальций-фосфорный обмен, состояние тканей зуба и пародонта.

ЭКЗАМЕНАЦИОННЫЕ ВОПРОСЫ

Общие вопросы

1. Предмет, задачи, основные разделы биохимии: статическая, динамическая, функциональная, клиническая. Основные методы, используемые в биохимии. Современная методология в новейших разделах биохимии (протеомике и метаболомике), клинической биохимии и лабораторной диагностике.
2. Этапы истории биохимии, заслуга отечественных и зарубежных учёных в её развитии. Значение биохимии в биологии, медицине. Крупные достижения биохимии последних лет, основные направления и перспективы развития.

Аминокислоты, белки, нуклеиновые кислоты. Азотистый обмен

3. Общее строение и особенности структуры природных аминокислот, физико-химические свойства (изомерия и стереоизомерия, электролитическая диссоциация и изоэлектрическая точка, растворимость и др.). Классификации: по физико-химическим свойствам, биологическому значению (заменимые и незаменимые), структуре боковых радикалов.
4. Протеиногенные и иные аминокислоты. Реакции посттрансляционной модификации аминокислот в белках. Роль отдельных аминокислот в организме (примеры). Аминокислоты – лекарственные препараты. Общие и специфические реакции обнаружения аминокислот.
5. Белки: определение, физико-химические свойства, форма, молекулярная масса, коллоидное состояние и факторы его стабилизации. Классификации по химическому строению, форме молекул, функциям. Определение последовательности аминокислот в белке (отщепление N-концевой аминокислоты, ферментативное и химическое расщепление по специфическим участкам, перекрывающиеся фрагменты).
6. Нативность и коллоидоустойчивость белка. Обратимое и необратимое осаждение (высаливание и др.) и денатурация белка, механизмы процессов и вызывающие их факторы (физические, химические). Реакции на белки в медицинской практике (биуретовая, с трихлоруксусной и сульфосалициловой кислотами), клинические пробы (тимоловая, Вельтмана). Методы оценки концентрации белка, разделения и очистки белков (электрофорез, хроматография и др.), значение методов.
7. Строение полипептидной цепи. Уровни пространственной организации белковой молекулы. Свойства пептидной связи, механизм и химизм её образования на рибосомах и путем нематричного синтеза. Типы связей между аминокислотами в молекуле белка (ковалентные – пептидная, дисульфидная, специфические сшивки в белках; слабые типы связей – водородные, ионные, гидрофобные), свойства и условия образования этих связей, показать все связи на рисунке.
8. Типы вторичной структуры (α -спираль, коллагеновая спираль, β -складчатость разной направленности, нерегулярная цепь, включая образование изгибов, поворотов типа «шпилька»), разнообразие надвторичных структур. Сравнительная характеристика третичной и четвертичной структуры, высшие структуры глобулярных (миоглобин и гемоглобин) и фибриллярных (коллагены, миозин) белков. Зависимость биологических свойств белка от структуры, примеры (миоглобин и гемоглобин, изменения при серповидноклеточной анемии). Домены. Кооперативные изменения конформации. Образование активных, аллостерических центров. Самосборка молекул, фолдинг, шапероны.
9. Биологические функции белков. Типы природных лигандов (простетические группы, кофакторы, протомеры, субстраты, транспортируемые вещества, аллостерические эффекторы – активаторы и ингибиторы), их взаимодействие с белками, примеры. Механизмы избирательности взаимодействия белка с лигандом («узнавание»), качественные характеристики и необходимое количество «опознавательных знаков», специфическое и слабые неспецифические взаимодействия, индуцированное соответствие и его детерминированность).

10. Виды, классификация, особенности строения и биологическая роль простых белков. Фибриллярные растворимые и нерастворимые белки. Белки плазмы крови, их функции. Белки, сопровождающие нуклеиновые кислоты (ядро клетки, сперматозоиды), характеристика типов гистонов (ключевые аминокислоты), участие в формировании нуклеосом. Белки пищевых растений.
11. Классификации сложных белков. Фосфо- и металлопротеины, гликопротеины и протеогликаны, липопротеины мембранные и транспортные, хромопротеины (ретинаяль-, флаво-, гемопротеины и их разнообразие): для каждого класса – особенности строения, химизм связи с небелковым компонентом, биологическая роль, характеристика основных представителей.
12. Разнообразие и строение нуклеотидов, связи. Свойства и функции отдельных моно- и динуклеотидов, роль в организме, примеры (АТФ, ГТФ и НАДФН, циклонуклеотиды, ФМН и ФАД, нуклеотидирование как активация субстратов – УДФГК и ФАФС, УДФ-сахара, ЦДФ-холин и др.).
13. Нуклеопротеины: типы, локализация, биологическая роль, структура белковой и небелковой части. Классификация и строение простетических групп. ДНК и РНК: физико-химические свойства, уровни организации молекул, типы связей в молекулах (первичная структура – с формулами; остальные – схематично). Характеристика белкового компонента нуклеопротеинов, связи нуклеиновых кислот с белком.
14. Основные пищевые источники белка, нормы белка в питании, критерии полноценности пищевых белков, коэффициент изнашивания, недифференцированный азот. Азотистый баланс: типы, характеристика. Переваривание белков в желудочно-кишечном тракте, регуляция. Синтез и роль соляной кислоты, протеиназы – проферменты и пути их активации, специфичность, экзо- и эндопептидазы, пристеночное и полостное пищеварение. Переваривание сложных белков.
15. Продукты переваривания белков в желудочно-кишечном тракте, всасывание аминокислот в кишечнике, транспортеры. Пути создания и расхода метаболического фонда аминокислот крови. Механизм транспорта аминокислот в клетки. Глутатион-зависимый транспорт.
16. Гниение белка в кишечнике: реакции декарбоксилирования и образование трупных ядов, распад серосодержащих и ароматических аминокислот (с получением газов, индола, скатола, фенола, крезола). Механизмы детоксикации в печени продуктов гниения, этапы биотрансформации токсинов – химическая модификация и конъюгация, участие ФАФС и УДФГК, получение и роль индикана.
17. Направления использования аминокислот в тканях (схема). Пути распада аминокислот (С-, N-концы, боковой радикал), основные продукты распада. Понятие о кетогенных и гликогенных аминокислотах, включение аминокислот в общие пути катаболизма, распад (ала, глу, асп) до CO_2 и H_2O , энергетический выход.
18. Роль отдельных аминокислот в обмене веществ (примеры реакций). Болезни, связанные с недостатком белка в питании, патологией метаболизма отдельных аминокислот (фен и тир: фенилкетонурия, тирозинемии, альбинизм и др.).
19. Протеолиз как способ образования и утилизации белков в клетке, внеклеточном матриксе, плазме крови. Понятие о каскадных системах протеолиза, значение. Убиквитин, маркировка дефектных белков. Протеасомы. Протеазы лизосом. Металлопротеиназы матрикса, разнообразие и субстраты. Ингибиторы протеиназ плазмы крови и тканей.
20. Типы дезаминирования, характерные для человека (неокислительное, окислительное, трансдезаминирование), и известные в природе (восстановительное, гидролитическое, внутримолекулярное, окислительное) и используемые микрофлорой полости рта, биологическая роль. Механизм неокислительного дезаминирования, продукты. Оксидазы аминокислот, роль витамина B_2 .
21. Механизм переаминирования. Роль витамина B_6 в реакциях, катализируемых аминоксиферазами, значение глутаматдегидрогеназы и её кофактора, сопряжение с биологи-

- ческим окислением (цикл Кребса). Практический смысл определения активности аланиновой и аспарагиновой аминотрансфераз в клинике, коэффициент де Ритиса.
22. Декарбоксилирование аминокислот: механизм реакции, значение ферментов и витамина В₆. Биогенные амины, их роль в организме. Синтез гистамина, серотонина, ГАМК, дофамина (реакции). Пути инактивации биогенных аминов, аминоксидазы и витамин В₂; O- и N-метилтрансферазы и S-аденозилметионин (примеры реакций).
 23. Основные источники аммиака в организме (схема), пути его обезвреживания (схема), причины и молекулярные механизмы токсичности. Пути утилизации аммиака: выведение из организма (синтез мочевины в печени, аммиогенез в почках) и использование для синтезов (азотистые основания, заменимые аминокислоты), в том числе синтеза транспортных форм – амидов аминокислот и аланина, аланиновый цикл. Химизм процессов утилизации, ферменты, роль в организме.
 24. Понятие остаточного азота, его фракции и их соотношение в крови, моче, слюне. Нормы и клиническое значение показателей мочевины, мочевой кислоты, креатина, креатинина, клиренса креатинина. Понятие азотемии и её виды, врожденная и вторичная гипераммониемия.
 25. Принципы биосинтеза и распада пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Источники азота для синтезов, продукты распада. Возможные нарушения, болезни.
 26. Генетический код, его основные положения. Структуры, участвующие в реализации генетического кода. Репликация ДНК, полуконсервативная схема репликации, модель катящихся колец, синтез ведущей и отстающей нитей, роль праймеров, ферментов, фрагменты Оказаки. Ошибки репликации, репарация повреждений. Теломераза. ПЦР-анализ.
 27. Механизм и значение биосинтеза РНК (транскрипции), ферменты. Процессинг различных видов РНК, кэпирование и полиаденилирование, сплайсинг, роль малых РНК.
 28. Схема биосинтеза белка (трансляция), основные фазы, ферменты, энергетика. Механизм активации аминокислот, ферменты. Роль рибосом в трансляции, аминоацильный и пептидильный центры. Представление об информосоме, полисомах. Регуляция (схема Жакоба, Моно), патология синтеза белка. Понятие о молекулярных болезнях. Мутации. ИФА-исследования в клинике.

Ферменты. Витамины

29. Ферменты: определение, сходство и отличия от минеральных катализаторов, строение, понятие об апоферменте и кофакторе, их биологическом взаимодействии и роли в катализе. Функциональные центры фермента, их строение. Коферментные функции витаминов. Изоэнзимы и множественные формы фермента.
30. Специфичность действия ферментов. Регуляция активности ферментов. Активаторы и ингибиторы, механизмы действия, виды ингибирования. Компарментализация. Механизм действия ферментов. Теории ферментативного катализа. Механизмы катализа. Зависимость скорости ферментативных реакций от различных факторов.
31. Классификация, номенклатура ферментов. Характеристика отдельных классов ферментов, характерные для них коферменты. Принципы определения активности ферментов, единицы измерения.
32. Локализация ферментов в клетке, маркерные ферменты. Конституциональные и индуцибельные ферменты. Значение ферментов и их ингибиторов в медицине: энзимопатии, энзимодиагностика, энзимотерапия.
33. Витамины: определение, классификация, основные функции в организме. Провитамины, витаминоподобные вещества и их отличия и сходство с витаминами, антивитамины. Потребность организма в витаминах, степени обеспеченности организма витаминами, причины гипер-, гипо-, авитаминозов. Роль печени в обмене витаминов.
34. Витамин А: химическая природа (строение), провитамины, активные формы, пищевые источники, суточная потребность, гиповитаминоз, токсичность, биологическая роль, участие в созревании тканей зуба.

35. Витамины группы D: строение, пищевые источники, суточная потребность, проявления недостаточности и гипервитаминоза. Провитамин D₃, синтез активных форм, механизм действия на клетку, биологическая роль, участие в метаболизме кальция и фосфатов, вклад в формирование кости и тканей зуба.
36. Витамин E (токоферолы). Биологическая роль, особенности строения, на основе которых реализуются функции, участие в системе антиоксидантной защиты, предохранении мембран от свободно-радикальной атаки. Природные источники, суточная потребность. Гиповитаминоз.
37. Витамин K. Биологическая роль, участие в синтезе Ca-связывающих gla-белков и формировании матрицы костной ткани. Природные источники, суточная потребность. Гиповитаминоз.
38. Витамин B₁, образование и строение ТДФ, его коферментные функции. Пищевые источники, суточная потребность. Симптомы гиповитаминоза, связанные с ним патологии и проявления токсичности продуктов обмена веществ.
39. Витамин B₆ (пиридоксол), биологическая роль. Строение активных форм, механизмы участия в обмене аминокислот (по группам -NH₂ и -COOH), фосфолипида. Гиповитаминоз. Пищевые источники, суточная потребность.
40. Амид никотиновой кислоты и рибофлавин: пищевые источники, суточная потребность, клиника гиповитаминозов. Строение коферментных форм (ФМН и ФАД, НАД и НАДФ), роль в реакциях метаболизма, НАД- и ФАД-зависимые ферменты в биологическом окислении, реакции синтеза НАДФ и понятие о метаболической энергии (использование восстановительной способности в реакциях синтеза и защиты).
41. Биотин и пантотеновая кислота как обязательные участники обмена жирных кислот, активные формы, механизм их действия. Биотин и VI класс ферментов. Гиповитаминозы. Источники, суточная потребность.
42. Витамины, участвующие в кроветворении (фолиевая кислота, кобаламин), понятие об активных формах, биологическая роль. Гиповитаминозы. Пищевые источники, суточная потребность.
43. Витамины C и P как регуляторы проницаемости мембран, строение и активный центр, другие функции. Гиповитаминозы. Пищевые источники, суточная потребность. Участие аскорбата в редокс-регуляции, созревании твёрдых тканей зуба, влияние на соединительную ткань и пародонт.

Биологическое окисление. Общие пути катаболизма

44. Обмен веществ, взаимосвязь анаболизма и катаболизма. Схема катаболизма основных пищевых продуктов. Понятие о специфических и общих путях катаболизма. Классификация макроэргических соединений, основные представители. Пути синтеза и использования АТФ.
45. Пируват: направления участия в метаболизме, роль витаминов, ферменты. Окислительное декарбоксилирование пирувата, принципы работы и энергетика пируватдегидрогеназного комплекса. Особенности метаболизма пирувата микрофлорой полости рта.
46. Ацетил-КоА, направления участия в метаболизме. Цикл трикарбоновых кислот: алгоритм окисления ацетил-КоА, продукция CO₂ и восстановленных эквивалентов, энергетическая ценность. НАД- и ФАД-зависимые дегидрогеназы, строение восстановленных и окисленных форм коферментов, важнейшие субстраты в разных видах обмена, роль в организме, связь с дыхательной цепью митохондрий.
47. Митохондрии: строение, биологическая роль. Понятие о биологическом окислении (схема), природа окисляемого субстрата. Структура дыхательной цепи (схема), основные звенья, механизм действия, пункты фосфорилирования, конечный акцептор. Роль убихинона, цитохромов, каталазы и пероксидаз. Электрохимический градиент и АТФ-синтаза, транспорт АДФ и АТФ. Патология энергетических процессов, разобщители транспорта электронов и синтеза АТФ.

Строение и обмен углеводов и липидов

48. Классификации, строение и биологическая роль углеводов. Природные источники. Особенности переваривания углеводов в полости рта, переваривание и всасывание в желудочно-кишечном тракте, роль пектинов, клетчатки. Нарушения переваривания, патологии ферментов.
49. Катаболическая фаза обмена углеводов: анаэробный и аэробный пути распада глюкозы, гликогенолиз, их энергетическая ценность. Глюконеогенез: локализация в клетке, субстраты, ферменты и коферменты, энергетический эффект, роль митохондрий, регуляция.
50. Строение и синтез гликогена, его молекулярная патология и гликогенозы. Глюконеогенез: химизм, локализация, источники, биологическая роль. Роль печени в обмене углеводов. Принципы нейро-гуморальной регуляции углеводного обмена, основные гормоны – регуляторы углеводного обмена. Характеристика сахарного диабета I и II типов.
51. Пентозофосфатный путь превращения глюкозы, биологическая роль, основные продукты. Окислительный путь образования пентоз и НАДФН (химизм), особенности использования НАДФН в эритроцитах, лейкоцитах. Представление о неокислительной стадии цикла, её роль в организме, участие ферментов, сопряжение с реакциями гликолиза.
52. Строение и классификация липидов клетки. Роль липидов в питании, переваривание и всасывание в желудочно-кишечном тракте. Синтез и роль желчных кислот. Судьба всосавшихся продуктов распада липидов. Ресинтез липидов в стенке кишечника.
53. Липопротеины. Транспортные формы липидов в крови, их характеристика и функции, значение ферментов. Участие транспортных липопротеинов в ожирении. Мобилизация жира из депо, липазы и роль гормонов, энергетика.
54. Фосфолипазы и клеточная мембрана, значение фосфолипаз A₂ и C, синтез биологически активных липидов (простагландины, лейкотриены и др.) и их роль. Витамин F: химическая природа, строение, пищевые источники, суточная потребность, роль в организме, механизм биологического действия.
55. Виды окисления жирных кислот. В-окисление, ферменты и коферменты, энергетическая ценность. Строение мультиферментного комплекса синтетазы жирных кислот, механизм синтеза. Обмен глицерола. Синтез нейтрального жира и фосфолипидов. Липотропные вещества.
56. Кетонные тела: синтез, строение, утилизация, энергетическая ценность. Значение кетонных тел для головного мозга и других тканей. Кетонемия, кетонурия. Заболевания и состояния, связанные с накоплением кетонных тел в крови.
57. Холестерол: строение, роль, синтез, направления использования и пути выведения. Транспортные формы, поступление в ткани, роль фермента ЛХАТ, нарушения транспорта. Атеросклероз. Индекс и коэффициент атерогенности. Синтез долихола. Липидные якоря: разнообразие, роль в организме.

Системы регуляции и взаимосвязь обменов.

Гормоны и мембраны. Нервная и мышечная ткани

58. Организация систем регуляции в организме, уровни эндокринной системы и иерархические взаимосвязи, механизмы взаимодействия гормонов. Понятие о тканевых гормонах.
59. Разнообразие, состав, структурно-функциональная организация мембран клетки. Типы рецепторов клеточной мембраны, механизмы взаимодействия с лигандами, трансдукция сигнала. Роль G-белков, ионных каналов, рецепторы-ферменты (примеры). Вторичные посредники, их разнообразие, пути и реакции синтеза, взаимодействие при передаче сигнала в клетку.
60. Механизмы взаимодействия гормонов с клеткой. Мембранная и внутриклеточная рецепция гормонов, роль вторичных мессенджеров (циклических нуклеотидов, монооксида азота, кальция, диацилглицерола, инозитолтрифосфата) в переводе внешнего сигнала внутрь клетки. Внутриклеточная рецепция тиреоидных и стероидных гормонов.

61. Механизмы переноса веществ через мембраны: диффузия, активный транспорт (Na^+ , K^+ -АТФаза, Ca^{2+} -АТФаза, H^+ -АТФаза), эндо- и фагоцитоз. Роль H^+ -АТФазы в создании кислой среды желудка и лизосом, ферменты лизосом в утилизации поступающих молекул, лизосомные болезни накопления. Роль повреждения мембран в гибели клетки и развитии патологии.
62. Разнообразие нервной и мышечной ткани. Локализация и функции. Значение синапса в разнообразии рецепторного аппарата клетки. Строение и функционирование синапса, роль ионов Ca^{2+} , ферментов, постсинаптическая мембрана и рецепторы.
63. Виды медиаторов, их синтез и инактивация, роль. Аминокислоты – медиаторы, обмен аминокислот (тирозина, глутамата, триптофана и др.), участвующих в образовании медиаторов. Нервно-мышечная передача, регуляция.
64. Нейропептиды, синтез и рецепция, роль в нервной ткани и организме, участие в болевых реакциях. Нервная ткань зуба, ноцицепторы челюстно-лицевой области, биохимия боли. Химизм боли после мышечной нагрузки.
65. Липиды нервной ткани. Строение и функции миелина, роль липидного и белкового компонента, миелиновые болезни. Фосфор нервной ткани. Специфические белки. Прионы и болезни. Нарушения при болезни Альцгеймера, причины и последствия.
66. Обмен углеводов и энергетика в нервной и мышечной ткани, роль глюкозы и O_2 , энергетические субстраты, значение гликолиза и глюконеогенеза, ЦТК и окислительного фосфорилирования, гипогликемии и гипоксии. АТФазы.
67. Саркоlemma и проведение сигнала. Сократительные, вспомогательные и регуляторные белки мышц, их роль. Посттрансляционная модификация белков, механизм сокращения/расслабления, источники АТФ и потребление O_2 . Креатинфосфат. Метаболический груз работающей мышцы. Патологии мышечной ткани, клиническая диагностика.
68. Особенности сердечной и гладкомышечной ткани. Жирные кислоты и миокард. Диагностика повреждений миокарда, оценка белков и ферментов.
69. Гормоны: классификации, роль в организме. Гормоны гипоталамуса. Химическая природа, разнообразие. Роль в нейро-гуморальной регуляции, поддержании гормонального гомеостаза организма. Нейрогормоны.
70. Гормоны аденогипофиза и задней доли. Химическая природа, принципы синтеза, регуляция, механизм действия на клетки-мишени. Патологии.
71. Строение и синтез гормонов щитовидной железы, регуляция образования, рецепция, биологическое значение, гипер- и гипofункция. Роль тиреокальцитонина при патологии обмена кальция и фосфатов.
72. Химическая природа, строение и механизм действия гормонов паращитовидных желез. Значение паратгормона в поддержании концентрации ионизированного кальция и фосфатов в крови, взаимодействие с другими гормонами и метаболитами витамина D, участвующими в минерализации кости и твёрдых тканей зуба, гипер- и гипofункция паратгормона в патологии обмена минералов костной ткани.
73. Гормоны поджелудочной железы. Химическая природа, механизм действия на клетку. Участие в регуляции пищеварения и механизмах формирования сахарного диабета.
74. Классификация гормонов надпочечников, химическая природа. Катехоламины: строение, рецепция в клетках-мишенях, химизм синтеза и инактивации, медиаторный и гормональный эффекты, обеспечение катаболических эффектов. Роль в стресс-реакции. Патология.
75. Минералокортикоиды, глюкокортикоиды: строение, принципы синтеза, регуляция, рецепция в клетках-мишенях, механизмы биологического действия. Роль в механизмах воспаления, стресс-реакции.
76. Женские половые гормоны (эстрогены и гестагены): химическая природа, места и принципы синтеза, роль ароматазы, регуляция образования, рецепция в клетках-мишенях, влияние на обмен веществ. Патология. Понятие о регуляторных веществах плаценты.

77. Андрогены: химическая природа, места и принципы синтеза, рецепция в клетках-мишенях, биологическая роль, участие в регуляции обмена веществ. Патология. Анаболики в медицине и спорте.
78. Связь углеводного обмена с другими видами обменов. Роль печени в обмене углеводов, липидов, белков.
79. Связь липидного обмена с другими видами обменов. Кетогенез и пути его нарушения при сахарном диабете.
80. Связь азотистого обмена с другими видами обменов, механизмы влияния азотистого обмена на другие виды обменов. Роль витаминов. Глюкогенные и кетогенные аминокислоты.

Биохимия крови, печени, почек и мочи

81. Химический состав крови. Неорганические и органические компоненты (азотсодержащие и безазотистые). Белки плазмы крови, фракции электрофореза белков. Характеристика альбуминов и глобулиновых фракций, белки острой фазы. Ферменты. Значение белков и ферментов крови в диагностике заболеваний. Роль витамина К в синтезе белков свертывающей системы, признаки недостаточности.
82. Кислотно-основное состояние (КОС). Основные показатели: pH, pCO₂, pO₂ и другие. Буферные системы крови. Участие эритроцитов, легких, почек в поддержании КОС. Виды нарушений КОС.
83. Синтез гема: локализация, предшественники. Железо, влияние его метаболизма на синтез гема. Гемопротейны (гемоглобин, миоглобин, цитохромы, каталаза), представление о строении, функции. Гемоглобины, нормальные и патологические варианты их белковой части.
84. Распад гемоглобина и гема, билирубин и билирубинглиукуронид, роль печени и почек в образовании и выделении желчных пигментов из организма. Значение определения желчных пигментов в диагностике болезней печени, желчных путей, крови.
85. Патологии синтеза и распада гемоглобина. Виды желтухи, биохимическая диагностика. Талассемии. Гемоглобинозы.
86. Полифункциональность печени. Комплексное участие в различных видах обмена веществ. Важнейшие механизмы обезвреживания веществ в печени: реакции модификации (гидроксилирование) и конъюгации. Цепь транспорта электронов при микросомальном окислении, ферменты и цитохром P-450, отличие от митохондриальной цепи. Микросомальное окисление ксенобиотиков, лекарственных веществ, понятие токсификации.
87. Роль печени и почек в обмене азотсодержащих соединений, выведении азотистых продуктов обмена. Примеры детоксикации продуктов гниения белков (крезол, скатол, индол) и токсичных продуктов обмена организма.
88. Макроэлементы и микроэлементы, их биологическая роль, участие в минеральном обмене. Направления участия гормонов в минеральном обмене.
89. Водно-электролитный обмен. Роль воды, пути поступления и выведения из организма, реакции синтеза. Регуляция и патологии, связанные с водно-электролитным обменом.
90. Общие свойства, составные части мочи в норме. Механизмы регуляции и этапы образования мочи. Понятие клиренса. Роль почек в поддержании кислотно-основного состояния (ацидогенез, аммионогенез), кальцийфосфорного обмена. Патологические компоненты мочи, определение и диагностическое значение.

Соединительная и костная ткани, ткани и жидкости полости рта

91. Соединительная ткань: разнообразие типов, распространение, функции в организме, клетки и компоненты межклеточного матрикса, организация и роль основного вещества, надмолекулярные белково-углеводные комплексы, характеристика фибриллярных структур. Ферменты деградации межклеточного матрикса. Пульпа – вариант специализированной соединительной ткани, особенности структурно-функциональной организации, клеточного состава, матрикса, белков, влияние на твердые ткани зуба.

92. Коллаген: аминокислотный состав, особенности пространственной структуры. Типы и группы коллагена, изоколлагены. Синтез, внутри- и внеклеточные этапы образования зрелого коллагена, характерные сшивки. Ферменты синтеза, созревания и деградации коллагена. Коллагеновые болезни.
93. Эластины: особенности первичной структуры, локализация, роль в организме, сходство и отличия от коллагенов. Значение внеклеточных этапов в механизмах формирования зрелой эластической ткани, специфические сшивки.
94. Гликопротеины и протеогликаны матрикса соединительной ткани. Адгезивные и антиадгезивные белки: основные представители, их строение, связь с углеводным компонентом, функции. Протеогликаны: классы и их представители, принципы организации молекул, понятие о коровых белках, строение ко́ра и узла связи с углеводным компонентом, механизмы синтеза и распада, роль долихола.
95. Характеристика гликанового компонента протеогликанов основного вещества соединительной ткани: классы гликозаминогликанов и их представители, локализация, биологическая роль, участие в образовании надмолекулярных агрегатов матрикса. Мукополисахаридозы.
96. Водно- и жирорастворимые витамины в поддержании здоровья соединительной и костной тканей. Строение и механизмы влияния данных витаминов, участие в ключевых реакциях.
97. Костная ткань: состав органического матрикса, коллагены и неколлагеновые белки, специфические белки и их роль в построении костной ткани, участие ферментов. Ремоделирование кости, особенности обмена альвеолярного отростка челюстной кости. Маркёры синтеза и деградации костной ткани. Регуляция обмена костной ткани.
98. Минеральные компоненты кости, механизмы минерализации, значение гормонов, витаминов, ферментов, цитрата и других веществ. Са-связывающие белки и их роль. Патологии костной ткани: остеопороз и остеомалация. Рахит как системное заболевание организма: причины, ранние и поздние проявления, механизмы возникновения.
99. Химический состав и особенности строения минеральных компонентов твёрдых тканей зуба. Аморфная фаза, созревание до апатитов, кристаллы апатитов и другие минералы. Минерализация тканей зуба: виды нуклеации, теории минерализации, органические молекулы в механизмах минерализации, регуляция. Вакансии, изоморфные замещения в кристаллах гидроксиапатитов, этапы замещения, значение.
100. Органическая и минеральная фаза дентина и цемента, сходство и различия с эмалью и костной тканью. Виды дентина и цемента, этапы формирования матрикса, минерализация, специфические белки. Регуляция. Биохимия плащевого, интер- и перитубулярного дентина. Особенности синтеза и организации первичного, вторичного, третичного дентина. Зубной ликвор: локализация, состав, образование, значение.
101. Химический состав эмали: неорганические и органические компоненты, их особенности. Эмалевая жидкость. Этапы синтеза эмали: белки эмбриональной и зрелой эмали, изменения при созревании, роль ферментов и наносфер, минерализация, де- и реминерализация. Макро- и микроэлементы в организации минералов эмали.
102. Поверхностные образования на эмали. Происхождение, химический состав, значение кутикулы и пелликулы, белки слюны в формировании пелликулы. Зубной налёт: химический состав, механизмы образования, участие микрофлоры в синтезе матрикса. Процесс минерализации бляшек, состав, формирование и созревание зубных камней.
103. Особенности биохимии кариесогенных микробов. Причины и стадии кариеса, биохимические аспекты в механизмах развития кариеса различных тканей зуба и профилактике кариеса.
104. Пародонт: основные компоненты, функции, биохимические особенности. Слизистая оболочка полости рта и десна: проницаемость, участие в местном иммунитете. Образование, состав, функции десневой жидкости, происхождение белков, ферментов. Участие нейтрофилов десневой жидкости в поддержании здоровья пародонта. Биохимия пародонтопатогенных микробов, роль десневых/пародонтальных карманов.

105. Активация перекисного окисления липидов при воспалении тканей пародонта, механизмы образования и эффекты продуктов перекисного окисления, синдром перекисидации, возможности антиоксидантной защиты. Влияние стресса, гипоксии, прооксидантов, антиоксидантов пищи, компонентов табака на состояние тканей полости рта.
106. Ротовая жидкость: происхождение, функции, основные параметры, состав. Нестимулированная и стимулированная слюна. Белки и ферменты слюны, происхождение, роль. Группы специфических белков, их разнообразие и функции. Участие белков слюны в неспецифической резистентности полости рта, синтез и особенности секреторных иммуноглобулинов. Параметры кислотно-основного состояния ротовой жидкости, механизмы его поддержания и типы нарушений.
107. Минеральные компоненты ротовой жидкости, их разнообразие и функции. Мицеллярное состояние слюны, вклад ионов кальция и фосфата, рН, электролитов. Участие слюны в метаболизме кальция, фосфатов, значение для состояния твердых тканей зуба, гормональная регуляция, роль витаминов. Понятие о биогеохимических эндемических районах. Фтор, его значение для состояния тканей зуба, вклад в поддержание здоровья эмали. Источники фтора и потребность в нем, гипофтороз и флюороз зубов.

ОТВЕТЫ
НА ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ И СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

ОТВЕТЫ НА ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

РАЗДЕЛ 1 «Белки, нуклеиновые кислоты: строение, свойства, функции»

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

РАЗДЕЛ 2 «Ферменты, витамины: строение, свойства, функции»

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

РАЗДЕЛ 3 «Введение в обмен веществ и энергии. Биологическое окисление, окислительное фосфорилирование»

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

РАЗДЕЛ 4 «Строение, функции, обмен углеводов»

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

РАЗДЕЛ 5 «Строение, функции, обмен липидов»

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

РАЗДЕЛ 6 «Обмен аминокислот, белков. Нейтрализация аммиака»

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

РАЗДЕЛ 7 «Обмен нуклеопротеинов. Матричные биосинтезы»

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

РАЗДЕЛ 8 «Регуляция обмена веществ. Регуляторные молекулы и клеточная мембрана»

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

РАЗДЕЛ 9 «Нервная и мышечная ткани. Медиаторы»

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

РАЗДЕЛ 10 «Соединительная, костная и зубные ткани»

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

РАЗДЕЛ 11 «Кровь. Моча и почки»

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

РАЗДЕЛ 12 «Ротовая жидкость. Десневая жидкость и пародонт»

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

ОТВЕТЫ НА СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

РАЗДЕЛ 1 "Белки, нуклеиновые кислоты: строение, свойства, функции"

1. При 50%-ном насыщении сульфатом аммония в осадке окажутся только глобулины, альбумины останутся в растворе. Чтобы выяснить, были ли в исследуемой жидкости альбумины, необходимо после отделения осадка довести её насыщение сульфатом аммония до 100%-ного. Можно внести в надосадочную жидкость реактивы, осаждающие белки любой природы (ТХУ, сульфосалициловую кислоту, соли тяжелых металлов) – появление осадка укажет на присутствие альбуминов.
2. Белок: А – будет передвигаться к аноду; Б – при рН 5,0 – к катоду, при рН 7,0 – к аноду; В – при рН 5,0 – к катоду, при рН 9,5 – останется на месте, при рН 11,0 – к аноду.
3. По свойствам на углеводород более похож первый пептид, так как он имеет только углеводородные радикалы. Этот же пептид лучше растворим в неводной среде, так как углеводородные радикалы гидрофобны. Оба пептида дают положительные биуретовую (более 2-х пептидных связей в каждом) и нингидриновую (на α -аминогруппу) реакции. Второй полипептид дает положительную ксантопротеиновую пробу (тирозин) и может участвовать в образовании солевых мостиков (свободная NH_2 -группа лизина и COOH -группа глутаминовой кислоты).

РАЗДЕЛ 2 "Ферменты, витамины: строение, свойства, функции"

1. При слабом нагревании происходит диссоциация олигомерного белка на субъединицы, что ликвидирует регуляторный аллостерический центр. В то же время активный центр может сохранять свою работоспособность.
2. Так как эффект адреналина состоит в активации энергетического обмена (борьба или бегство), то его действие должно активировать фермент, обеспечивающий распад жира и его сжигание при мышечной работе. Из условия задачи известно, что гормон усиливает фосфорилирование ферментов, и поэтому логично предположить, что и липаза будет активироваться при фосфорилировании.
3. Происходит конкурентное ингибирование микробных ферментов, ответственных за синтез фолиевой кислоты. В результате происходит нарушение синтеза бактериями собственного тетрагидрофолата. После лечения рекомендовано применение витаминов группы В и пробиотиков для восстановления микрофлоры.

4. Пиридоксин участвует в переаминировании аминокислот. В первом случае происходит образование необходимых аминокислот из данных четырех, во втором случае это не столь необходимо.

РАЗДЕЛ 3 "Введение в обмен веществ и энергии. Биологическое окисление, окислительное фосфорилирование"

1. В нормальных митохондриях скорость движения электронов по дыхательной цепи строго согласована с потребностью в АТФ. Поэтому, если потребление АТФ сравнительно невелико (т.е. ее концентрация высока), то соответственно небольшой оказывается и скорость переноса электронов, которую подавляет наличие высокого электрохимического градиента. Разобщающие агенты нарушают строгое согласование количества АТФ и скорости электронов, встраиваясь в мембрану и вызывая снижение протонного градиента без участия АТФ-синтазы. В результате электроны быстро двигаются по цепи и восстанавливают кислород, однако АТФ не синтезируется и его концентрация низка. Соотношение Р/О, таким образом, снижается. Высокая скорость движения электронов по дыхательной цепи вызывает снижение их свободной энергии, часть которой рассеивается в виде тепла, что и вызывает обильное потоотделение и повышение температуры тела. При использовании разобщителей *in vivo* их эффект по снижению количества АТФ будет проявляться в основном в клетках, имеющих много митохондрий, т.е. в нервных клетках и миокарде, что проявится как нарушение деятельности нервной системы и сердца.
2. Низкий коэффициент Р/О означает, что большая часть энергии веществ рассеивается в виде тепла, а не тратится на синтез АТФ. Это позволяет животным поддерживать температуру тела на нужном уровне. Механизмом, отвечающим за низкий коэффициент Р/О, является разобщение процессов окисления и фосфорилирования. Его обеспечивает термогенин – белок митохондриальной мембраны бурых жировых клеток.

РАЗДЕЛ 4 "Строение, функции и обмен углеводов"

1. Нет, уровень сахара в крови ребенка мог повыситься непосредственно перед обследованием вследствие развития стресс-реакции, для которой характерно увеличение уровня адреналина в крови и тканях. Адреналин активизирует процессы увеличения концентрации глюкозы в крови (например, гликогенолиз в печени, глюконеогенез).
2. При беге на дистанцию 5000 м лучше, чем на 100-метровой, ткани обеспечиваются кислородом за счет увеличения скорости объема кровотока. Кислородная задолженность организма меньше, поэтому активированы аэробные процессы обмена, уровень молочной кислоты в крови и тканях ниже, чем у спортсмена, пробежавшего 100 м.
3. Одной из функций пентозофосфатного цикла является поставка пентозофосфатов для синтеза нуклеиновых кислот. После кровотечения усиливается регенерация элементов крови, для синтеза которых нужны нуклеиновые кислоты. Поэтому усилятся процессы пентозофосфатного цикла, соответственно активируются его ферменты, в частности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, транскетолаза и другие, которые и целесообразно исследовать для проверки вывода.

РАЗДЕЛ 5 "Строение, функции и обмен липидов"

1. При задержке попадания желчи в 12-перстную кишку нарушается (угнетается) активация панкреатической липазы, ухудшаются переваривание жиров, всасывание жирных кислот и жирорастворимых витаминов, ухудшается моторная функция кишечника, развивается гиперхолестеролемия.
2. Миокард лучше, чем скелетная мышца, обеспечен энергетическими резервами, в нем содержится больше липидов, при окислении дающих много энергии (1 г углеводов – 4,1 ккал (17,2 кДж), жиры – 9,3 ккал (38,9 кДж). Но в молекуле жирной кислоты значительно

меньше, чем в углеводах, кислорода, поэтому на окисление 1 г жира требуется 2019 мл O_2 , тогда как на 1 г гликогена всего 829 мл. В энергетическом балансе миокарда ведущую роль играют более эффективные аэробные процессы, но они делают его чувствительным к гипоксии (кислородному голоданию), что может стать причиной инфаркта, тогда как скелетная мышца активно работает и при недостатке кислорода.

3. Уменьшение углеводов в диете ребенка привело к нарушению цепочки "глюкоза → пируват → оксалоацетат" и замедлению скорости ЦТК. Прежнее потребление жира и окисление жирных кислот вызвали относительный избыток ацетил-SКоА, который не может теперь сгореть в ЦТК («жиры сгорают в пламени углеводов»). Это привело к кетонемии, метаболическому ацидозу. Увеличение глюконеогенеза из аминокислот усилило процессы дезаминирования и накопление аммиака, но синтез мочевины тормозится из-за нехватки энергии АТФ при нарушении ЦТК, поэтому развивается гипераммониемия. Для назначения рационального лечения целесообразно определить содержание глюкозы и мочевины в крови, кетонных тел в моче, оценить кислотно-основное состояние.

РАЗДЕЛ 6 "Обмен белков и аминокислот. Обезвреживание аммиака"

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. Проявление аллергии (зуд, краснота, отек) в значительной степени связаны с увеличением концентрации гистамина в тканях. Поэтому у больных целесообразно исследовать содержание гистамина и активность фермента гистаминазы, катализирующей его превращение из аминокислоты гистидина.
3. Наследственно обусловленный недостаток фенилаланингидроксилазы блокирует метаболические превращения фенилаланина в тирозин. В тканях, крови, моче возрастает содержание фенилаланина, его кето- и оксипродуктов. У ребенка резко замедляется умственное развитие, поэтому болезнь называется фенилпировиноградная олигофрения или фенилкетонурия. В питании должны быть ограничены продукты с содержанием фенилаланина.
4. Основным процессом биоэнергетики клетки является ЦТК (цикл трикарбоновых кислот). Снижение уровня АТФ ведет к нарушению функции клеток мозга. При взаимодействии α -кетоглутарата с аммиаком синтезируется аминокислота глутамат, который, связывая аммиак, образует нетоксичный глутамин. Эти реакции являются первичными, если не единственными путями детоксикации аммиака в мозге. Интенсивное их осуществление может нарушить течение ЦТК и энергообеспечение клеток мозга.

РАЗДЕЛ 7 "Обмен нуклеопротеинов. Матричные биосинтезы"

1. Высокая концентрация мочевой кислоты в моче обнаруживается при гиперурикемии любого генеза. В данном случае избыток мочевой кислоты у ребенка является следствием сильного дефекта фермента гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы, ответственного за реутилизацию пуриновых оснований (синдром Леша-Нихана). У взрослых избыток мочевой кислоты бывает при подагре или потреблении пуриносодержащих продуктов.
2. Фолиевая кислота в своей активной форме N^5, N^{10} -метилен-ТГФК участвует в синтезе тимидилмонофосфата (ТМФ), являющегося абсолютно необходимым для синтеза ДНК и, следовательно, для деления клеток. Из-за прекращения деления количество эритроцитов сокращается (анемия), но их рост не останавливается (мегалобластическая), аналогично развивается лейкопения и тормозится деление клеток эпителия (слизистые и кожа).
3. Заболевание – серповидно-клеточная анемия, при которой в ДНК имеет место замена ЦТТ на ЦАТ. Следствием этого становится смена нуклеотида в иРНК и далее замещение глутамата на валин в β -цепи гемоглобина.

4. Топоизомеразы являются ферментами, обеспечивающими разрезание нитей ДНК при ее раскручивании во время репликации. Если фермент заблокировать, то разрезания и расплетания не произойдет и репликация остановится, клетка не будет делиться. На этом и основан лечебный противоопухолевый эффект препарата цисплатин.

РАЗДЕЛ 8 "Регуляция обмена веществ. Регуляторные молекулы и биомембрана"

1. Замедление физического и умственного развития, снижение интенсивности процессов обмена, в том числе энергетического, характерно для гипофункции щитовидной железы (может быть недостаток йода в организме, нарушена центральная регуляция или деятельность самой железы). В выраженной степени болезнь носит название «кретинизм».
2. Указанные жалобы характерны для сахарного и несахарного диабета. Для их дифференциации и оценки состояния метаболизма при диабете целесообразно определять следующие наиболее информативные показатели. Кровь: сахар натощак, кетоновые тела, холестерол и липиды, при необходимости тест толерантности к глюкозе. Моча: сахар, плотность, кетоновые тела. В случае сахарного диабета – недостаточность инсулина β -клеток поджелудочной железы, при несахарном диабете – антидиуретического гормона (вазопрессина, синтезируемого гипоталамусом и секретируемого задней долей гипофиза).
3. Высокая утомляемость, частые гипогликемические состояния, повышенная пигментация кожи и другие симптомы характерны для первичной хронической недостаточности коры надпочечников (болезни Аддисона) и снижения синтеза стероидных гормонов (глюко-, минералокортикоидов и др).

РАЗДЕЛ 9 "Нервная и мышечная ткани. Медиаторы"

1. Для больных алкоголизмом наряду с расстройствами функций ЦНС характерны рост концентрации кетокислот и пентоз в крови, отрицательный азотистый баланс, выделение повышенных количеств аминокислот и креатина с мочой, недостаточность тиамин. Кофермент витамина B_1 – тиаминдифосфат, участвующий в окислительном декарбоксилировании α -кетокислот, переносе гликоальдегидного радикала от кето- к альдосахарам. Для мозга токсичны высокие концентрации пирувата, возникающие при угнетении пируватдегидрогеназы на фоне B_1 -дефицита. Богаты тиамином отруби, бобовые, дрожжи.
2. Дифференцировать приступ ишемической болезни сердца и язвенной болезни желудка (или 12-перстной кишки) поможет определение в крови активности ферментов АсАТ и АлАТ, изоферментов креатинфосфокиназы (КФК) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ). При ишемической болезни сердца вследствие синдрома цитолиза повышены показатели активности АсАТ (много в митохондриях кардиомиоцитов) и характерных для сердечной мышцы изоферментов МВ-КФК, ЛДГ₁ и ЛДГ₂.
3. Развитие эпилептиформных припадков является характерным признаком пиридоксиновой недостаточности (витамин B_6). Повышенная возбудимость центральной нервной системы и периодические судороги связаны с нарушением обмена аминокислот и недостаточным синтезом из глутамата γ -аминомасляной кислоты (ГАМК), являющейся тормозным медиатором нейронов мозга.

РАЗДЕЛ 10 «Соединительная, костная и зубные ткани»

1. Нарушения связаны с недостатком витамина роста (ретинола). Витамин А в организме окисляется до ретиноевой кислоты, которая через внутриклеточные рецепторы влияет на рост, дифференцировку и репродукцию тканей, в частности – на рост костей (усиливает синтез хондроитинсульфата, способствует минерализации), барьерную функцию кожи, слизистых оболочек, проницаемость биомембран. При гиповитаминозе поражается эпите-

лий желудочно-кишечного тракта (гастрит, колит), других органов (цистит, пиелит), останавливается рост костей. В виде ретинала витамин в комплексе с родопсином участвует в фоторецепции. Снижение сумеречного зрения («куриная слепота») связано с нарушением синтеза родопсина, сопровождается поражением глазного яблока (ксерофтальмия, переходящая в кератомалицию).

2. Причина в гиперфункции паращитовидных желез и избытке паратгормона. К гормонам, регулирующим фосфорно-кальциевый обмен, относят не только паратгормон, но и гормон щитовидной железы – кальцитонин, а также активные формы витамина D – кальцитриолы ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ и $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$). В межклеточном матриксе кости основным минералом являются гидроксипатиты $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, в образовании которых участвуют ионы кальция и фосфата. При разрушении кости в крови повышена активность изофермента кислой фосфатазы (тарtratрезистентная кислая фосфатаза).
3. Клинические проявления характерны для флюороза. У взрослых людей в здоровой эмали содержание белков 0,5–1,0 %, основными из которых являются энамелины и амелогенины. В питьевой воде содержание фтора в норме до 1 мг%. Анионы фтора участвуют в формировании фторапатитов $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$, повышающих прочность и кислотоустойчивость эмали, при избытке фтора нарушается формирование эмали.
4. Причиной увеличения выведения кальция с мочой у лежачего больного в кардиологическом стационаре может быть гиподинамический остеопороз (уменьшение костной массы, сопровождающееся «вымыванием» Ca^{2+} из костей в кровь и экскреция его в мочу), что не связано с основным заболеванием. В норме содержание кальция в крови 2,0–2,6 ммоль/л, выведение с мочой 2,5–7,5 ммоль/сут.

РАЗДЕЛ 11 "Кровь. Моча"

1. В крови при сахарном диабете увеличивается содержание глюкозы (гипергликемия), кетонных тел (кетонемия), мочевины (азотемия). Накапливается гликозилированный гемоглобин, холестерол. В моче – сдвиг pH в кислую сторону, глюкозурия, кетонурия, азотурия, повышение удельного веса мочи за счет глюкозы. В данном случае – гипергликемия, при которой превышен почечный порог для глюкозы, которая появляется в моче (около 5 ммоль/л). Гликозилирование гемоглобина является следствием постоянно повышенной концентрации глюкозы в крови.
2. В норме половину остаточного азота крови составляет азот мочевины, для уточнения диагноза необходимо дополнительно определить этот показатель в крови. При нарушении выделительной функции почек остаточный азот повышен преимущественно за счет азота мочевины, при нарушении мочевинообразовательной функции печени доля азота мочевины в крови падает.
3. Так как pH снижен, ставится диагноз ацидоз. Повышение парциального давления CO_2 указывает на причину ацидоза – накопление угольной кислоты из-за нарушения ее выведения. Избыток ионов HCO_3^- отражает накопление и диссоциацию угольной кислоты, и, в первую очередь, компенсационную реабсорбцию карбонатов почками. Клиническая картина подтверждает диагноз дыхательного ацидоза. Компенсация происходит через "метаболический алкалоз", т.е. выведение почками иона H^+ посредством активации аммонийогенеза и ацидогенеза. Щелочной резерв показывает сумму всех буферных оснований крови и повышен за счет избытка карбонат-ионов.
4. При отравлении CO гемоглобин превращается в карбогемоглобин, не способный связывать и переносить O_2 . Кроме того, CO ингибирует IV комплекс дыхательной цепи митохондрий (цитохромоксидазу), прекращая тканевое дыхание. Гемоглобин имеет четвертичную структуру: объединяет в единую функциональную систему 4 полипептидные цепи (субъединицы) с третичной структурой. Кооперативное взаимодействие 4-х субъединиц гемоглобина обеспечивает S-образность кривой его насыщения кислородом. В плазме крови к диагностически значимым ферментам с четвертичной структурой относят креа-

тинфосфокиназу, лактатдегидрогеназу (при инфаркте миокарда диагностически значимы их изоферменты МВ-КФК, ЛДГ₁ и ЛДГ₂).

РАЗДЕЛ 12 "Ротовая жидкость. Десневая жидкость и пародонт"

1. Признаки характерны для ксеростомии. Основные причины плохого отделения слюны: нейрогенные механизмы, образование камней в слюнных протоках, а также дефекты системы аквапоринов, вследствие которых снижается содержание жидкости в слюне, выделяющейся из слюнных протоков. Липкие полисахариды глюкановой и фруктановой природы отличаются высокой адгезией к эмали зуба и способностью фиксировать микрофлору. В результате в зубном налёте количество микроорганизмов, превращающих сахарозу и глюкозу в лактат, в тысячи раз выше, чем в слюне. Лактат способствует растворению апатитов эмали и других тканей зуба. Аутоиммунным заболеванием, сопровождающимся пониженной секрецией слюны с высокой вязкостью, является болезнь Шегрена.
2. Изменения характерны для пародонтита. В слюне здорового человека находятся ингибиторы протеиназ: α_1 -ингибитор протеиназ, α_2 -макроглобулин, цистатины (S, S-HSP-12, SA, SN, SAI, SAII), кислотостабильные ингибиторы протеиназ. Для получения лекарственных препаратов, содержащих ингибиторы протеиназ (трасилол, контрикал, пантрипин, ингитрил и др.), используют слюнные железы животных. К образованию центров кристаллизации на поверхности эмали способны α -кетокислоты – продукты аминотрансферазных реакций. В норме предотвращению пародонтита способствует комплекс хорошо согласованных факторов: постоянный ток слюны, иммуноглобулины слюны (A, D, E, M, G, особенно sIg A), лакто- и миелопероксидазы, продукты окисления тиоцианатов, лизоцим, нуклеазы (ДНКазы, РНКазы), специфические секреторные белки (богатые пролином, цистатины, гистатины), анионные и катионные гликопротеины и др.
3. В протромбине остатки глутаминовой кислоты модифицируются согласно реакции (глутамат + $\text{CO}_2 \rightarrow \gamma$ -карбоксихлутамат). Реакцию катализирует глутаматкарбоксилаза, кофермент – витамин К (филло-, менахиноны). Процесс γ -карбоксихлутаматирования характерен не только для протромбина, но и для других Са-связывающих белков свертывающей системы крови (проконвертин, фактор Кристмаса, фактор Стюарта-Прауэра), костной и зубных тканей (остеокальцин и подобные gla-белки). Ион Ca^{2+} образует связи с обеими карбоксильными группами γ -карбоксихлутамата.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Основная литература

1. Биохимия [Электронный ресурс] : учебник для студентов медицинских вузов / ред. Е. С. Северин. – 5-е изд., испр. и доп. - Электрон. текстовые дан. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. - 768 с. : Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/>
2. Биохимия [Текст] : учебник для студентов медицинских вузов / ред. : Е. С. Северин. – 5-е изд. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 768 с.
3. Биохимия с упражнениями и задачами [Электронный ресурс] : учебник для вузов / ред. Е. С. Северин. - Электрон. текстовые дан. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 384 с. : Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/>
4. Березов, Т. Т. Биологическая химия [Электронный ресурс] : учебник для студентов медицинских вузов / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. – 3-е изд., стереотип. – Электрон. текстовые дан. – М. : Медицина, 2008. – 704 с. : Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/>
5. Вавилова, Т. П. Биохимия тканей и жидкостей полости рта [Текст] : учебное пособие для студентов медицинских вузов / Т. П. Вавилова. – 2-е изд., испр. и доп. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 208 с.
6. Вавилова, Т. П. Биохимия тканей и жидкостей полости рта [Электронный ресурс] : учебное пособие для студентов медицинских вузов / Т. П. Вавилова ; Московский медикостоматологический университет (М.), кафедра биохимии. – 2-е изд., испр. и доп. – Электрон. текстовые дан. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 208 с. : Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/>

Дополнительная литература

1. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии [Электронный ресурс] : пер. с англ. / ред.: К. Уилсон, Дж. Уолкер. – 2-е изд. электронное. – Электрон. текстовые дан. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015. – 1 on-line, 855 с. : Режим доступа: <http://books-up.ru>
2. Щербак, И. Г. Биологическая химия [Текст] : учебник для студентов медицинских вузов / И. Г. Щербак ; Санкт-Петербургский медицинский университет им. И. П. Павлова (СПб.). – СПб. : СПбГМУ, 2005. – 480 с.
3. [Гринштейн, Б.](#) Наглядная биохимия [Текст] : пер. с англ / Б. Гринштейн, А. Гринштейн. – М. : ГЭОТАР Медицина, 2000. – 119 с.
4. Трудные вопросы биохимии [Текст] : избранные лекции по общей и частной биохимии: учебное пособие для студентов / Сибирский медицинский университет (Томск) ; ред. Т. С. Федорова, ред. В. Ю. Серебров. – Томск : б. и., 2006 – . Часть 1. – 2006. – 318 с.
5. Клиническая лабораторная диагностика. Интерпретация результатов лабораторных исследований [Электронный ресурс] : учебное пособие / Сибирский медицинский университет (Томск) ; ред. Н. В. Канская ; Сибирский медицинский университет (Томск). – Электрон. текстовые дан. – Томск : Сибирский государственный медицинский университет, 2015. – 144 с. : Режим доступа: <http://irbis64.medlib.tomsk.ru>
6. Сборник ситуационных задач по биохимии [Электронный ресурс]: учебное пособие / О.А.Тимин [и др.] ; Сибирский медицинский университет (Томск). – Электрон. текстовые дан. – Томск : Сибирский государственный медицинский университет, 2016. – 166 с. : Режим доступа: <http://irbis64.medlib.tomsk.ru>

ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Таблица протеиногенных аминокислот

Названия: эмпирическое, химическое, буквенные коды (русско-, англо-язычные)	Химическая формула Ниже заменимая (З) или незаменимая (НЗ)	Физико-химические свойства: заряд, значение ИЭТ, полярность и т.д.	Биологическая роль	Реакции посттрансляционной модификации или активная форма (если есть)	Биохимические функции (химизм участия в реакциях метаболизма)
1	2	3	4	5	6

Примечание:

1) по материалу раздела 1 заполнить в таблице графы 1–4, $\text{NH}_2\text{-CH-COOH}$
 формулы аминокислот писать в следующем виде:

$$\begin{array}{c} \text{NH}_2\text{-CH-COOH} \\ | \\ \text{R} \end{array}$$

2) по мере изучения материала раздела 6 заполнить графы 5–6 и дополнить графы 1–4,

3) при изучении частных вопросов биохимии и биохимии полости рта (разделы 9-12) дополнить графы таблицы.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Таблица витаминов

Название и химическая структура (формулы – для производных аминокислот и холестерола)	Место и реакции синтеза	Место в иерархии гормонов: регуляция синтеза и секреция гормона, регуляция действия других гормонов	Органы-мишени	Локализация рецепторов, механизм действия	Влияние на обмен веществ (углеводный, белковый, липидный, минеральный, водный) и функции организма	Гипо- и гиперфункция	
1	2	3	4	5	6	7	8

Примечание:

1) информацию представить по основным гормонам гипоталамуса, гипофиза, поджелудочной, надпочечников и половых желез, щитовидной и паращитовидных желез, гормонально активным формам витамина D₃ (разделы 2,8),

2) дополнить графы таблицы при изучении частных вопросов биохимии и биохимии полости рта (разделы 9-12).

КЛАССИФИКАЦИЯ И НОМЕНКЛАТУРА ФЕРМЕНТОВ

В 1961 г. в Москве Комиссия по ферментам Международного биохимического союза (IUBMB) приняла современную систематическую классификацию ферментов, учитывающую их реакционную и субстратную специфичность. Согласно классификации ферменты делят на **классы** – по типу катализируемой реакции, класс делят на **подклассы** – по природе атакуемой химической группы, подклассы делят на **подподклассы** – по характеру атакуемой связи или по природе акцептора или кофермента. Всего выделяют 6 классов:

I. Оксидоредуктазы

II. Трансферазы

III. Гидролазы

IV. Лиазы

V. Изомеразы

VI. Лигазы

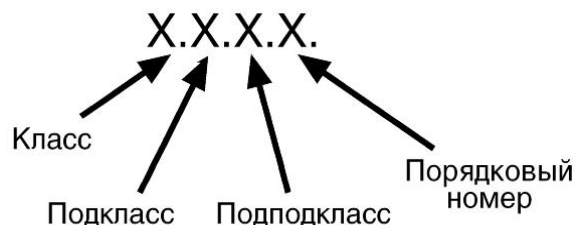
Каждому ферменту присвоен классификационный номер. Так, *алкогольдегидрогеназа*

КФ 1.1.1.1. (оксидоредуктаза, действует на ОН-группу донора с НАД⁺ в качестве акцептора, с 1-ым порядковым номером в своем подподклассе).

Ферменты могут иметь тривиальное и систематическое название:

1. **Тривиальное** название сложилось исторически, более употребимо (пепсин, трипсин). Иногда к названию субстрата добавляют окончание "-аза" (уреаза, амилаза, липаза). Однако у всех ферментов есть и систематическое название.

2. **Систематическое** название присваивают согласно современной классификации (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>). Зачастую оно сложно в использовании, тогда его упрощают и вводят **рабочее** название.



I класс. Оксидоредуктазы

Ферменты катализируют окислительно-восстановительные реакции, лежащие в основе биологического окисления. Коферменты: НАД⁺, НАДФ⁺, ФАД, ФМН, убихинон, глутатион, липоат. В классе 22 подкласса, основные включают группы ферментов, действующие на:

- 1.1. СН-ОН группу доноров;
- 1.2. альдегидную/кетонную группу доноров;
- 1.4. СН-NH₂ группу доноров;
- 1.5. СН-NH группу доноров;
- 1.6. НАДН или НАДФН в качестве доноров;
- 1.8. S-содержащие группы доноров;
- 1.9. гем-содержащие доноры;
- 1.11. Н₂О₂ в качестве акцептора;
- 1.12. водород в качестве донора;
- 1.13. один донор с включением О₂;
- 1.14. два донора с включением О₂;
- 1.15. О₂^{•-} в качестве акцептора.

На **подподклассы** делят в зависимости от акцептора – НАД⁺ / НАДФ⁺ (1.1.1., 1.2.1., 1.3.1., 1.4.1.), дисульфиды (1.2.4.), кислород (1.3.3.).

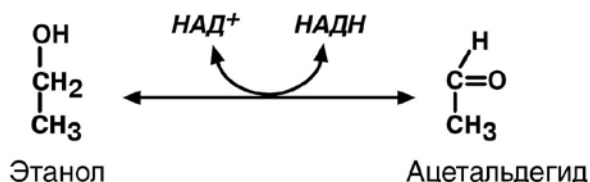
Наиболее распространенные **рабочие названия** оксидоредуктаз:

1. **Дегидрогеназы** – оксидоредуктазы, катализируют дегидрирование субстрата, когда акцептор водорода – любая молекула, кроме кислорода.
2. **Редуктазы** – оксидоредуктазы, для которых перенос водорода от молекулы донора трудно доказать.
3. **Оксидазы** – оксидоредуктазы, катализируют окисление субстратов с молекулярным кислородом в качестве акцептора электронов без включения кислорода в молекулу субстрата.

4. **Моноксигеназы** – оксидоредуктазы, катализируют внедрение 1 атома кислорода в молекулу субстрата с молекулярным кислородом в качестве донора.
5. **Диоксигеназы** – оксидоредуктазы, катализируют внедрение 2 атомов кислорода в молекулу субстрата с молекулярным кислородом в качестве донора.
6. **Пероксидазы** – оксидоредуктазы, катализируют реакции с пероксидом водорода в качестве акцептора электронов.

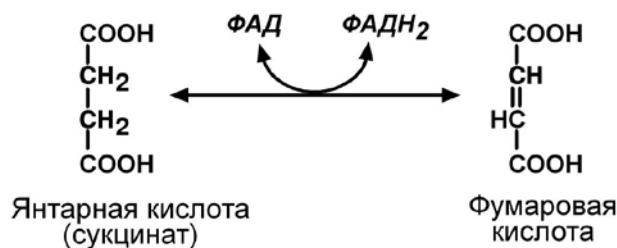
Систематическое название оксидоредуктаз образуется так:
 донор электронов : акцептор электронов – оксидоредуктаза.

Пример 1



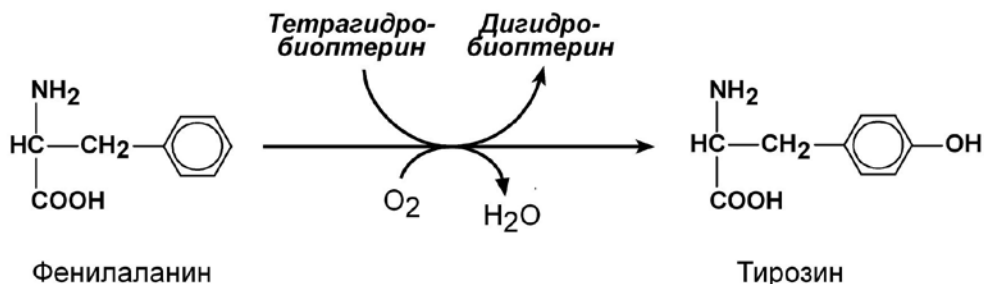
Систематическое название	Алкоголь:НАД-оксидоредуктаза
Рабочее название	Алкогольдегидрогеназа
Класс	1. Оксидоредуктазы
Подкласс	1.1. Действующие на СН-ОН-группу доноров
Подподкласс	1.1.1. НАД ⁺ / НАДФ ⁺ в качестве акцептора
Классификационный номер	КФ 1.1.1.1.
Кофакторы	Никотинамидадениндинуклеотид, Fe или Zn

Пример 2



Систематическое название	Сукцинат:ФАД-оксидоредуктаза
Рабочее название	Сукцинатдегидрогеназа
Класс	1. Оксидоредуктазы
Подкласс	1.3. действующие на СН-СН-группу доноров
Подподкласс	1.3.99. с ФАД в качестве акцептора
Классификационный номер	КФ 1.3.99.1.
Кофактор	Флавинадениндинуклеотид

Пример 3



Систематическое название	Фенилаланин. Тетрагидробиоптерин: кислород-оксидоредуктаза
Рабочее название	Фенилаланин-4-монооксигеназа
Класс	1. Оксидоредуктазы
Подкласс	1.14. Два донора с включением молекулярного кислорода
Подподкласс	1.14.16. С восстановленным птеридином в качестве донора и включением 1 атома кислорода
Классификационный номер	1.14.16.1
Кофакторы	Тетрагидробиоптерин. Железо.

II класс. Трансферазы

Катализируют реакции переноса различных групп от одного субстрата (донор) к другому (акцептор), участвуют в реакциях взаимопревращений различных веществ, обезвреживания природных и чужеродных соединений. Коферменты: пиридоксальфосфат, коэнзим А, ТГФК, метилкобаламин. В **классе** 9 подклассов – в зависимости от строения переносимых групп, на **подклассы** ферменты делят в зависимости от вида переносимой группы:

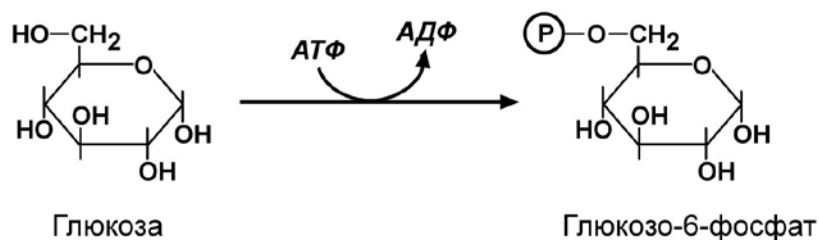
- 2.1. переносящие одноуглеродные фрагменты;
- 2.2. переносящие альдегидные и кетогруппы;
- 2.3. переносящие ацильные группы;
- 2.4. переносящие гликозильные группы;
- 2.6. переносящие азотсодержащие группы;
- 2.7. переносящие фосфорсодержащие группы;
- 2.8. переносящие сульфосодержащие группы;
- 2.9. переносящие селенсодержащие группы.

На **подподклассы** делят в зависимости от природы переносимой группы. Например: подподкласс 2.1.1. – метил; подподкласс 2.1.2. – карбоксиметил или формил; подподкласс 2.6.1. – амино-, амидино-, оксиаминогруппы.

Систематическое название трансфераз образуется так:

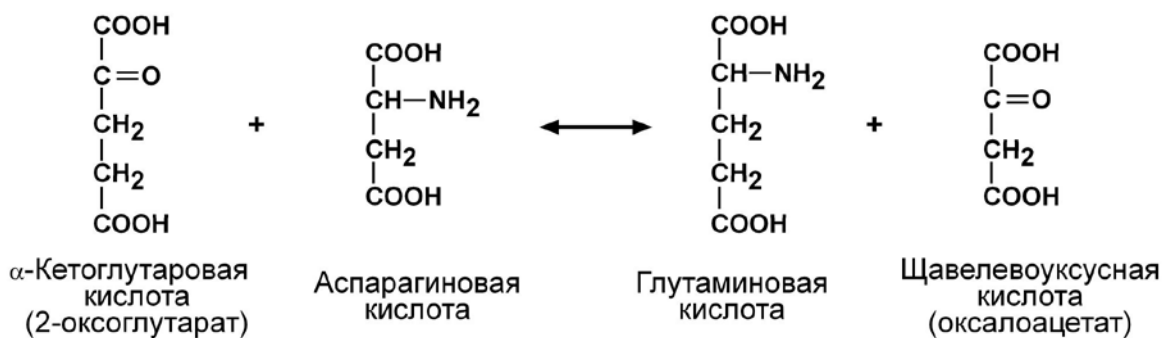
Донор группы : акцептор группы – переносимая группа трансфераза.

Пример 1



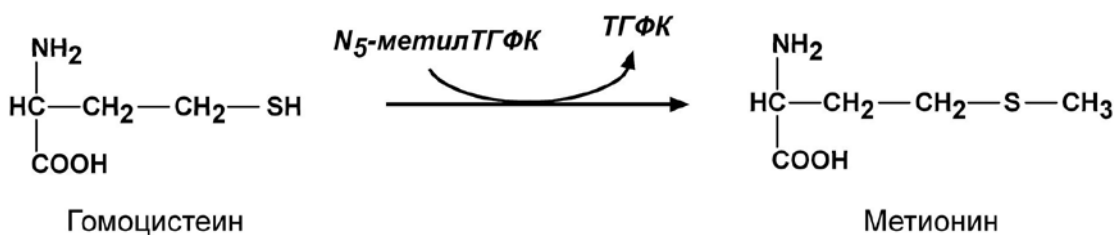
Систематическое название	АТФ:D-гексоза-6-фосфотрансфераза
Рабочее название	Гексокиназа
Класс	2. Трансферазы
Подкласс	2.7. Переносящие фосфорсодержащие группы
Подподкласс	2.7.1. Спиртовая группа в качестве акцептора
Классификационный номер	КФ 2.7.1.1.
Кофактор	Магний

Пример 2



Систематическое название	L-Аспарат:2-оксоглутарат-аминотрансфераза
Рабочее название	Аспаратаминотрансфераза
Класс	2. Трансферазы
Подкласс	2.6. Переносящие азотсодержащие группы
Подподкласс	2.6.1. Аминотрансферазы
Классификационный номер	КФ 2.6.1.1.
Кофермент	Пиридоксальфосфат

Пример 3



Систематическое название	5-метилтетрагидрофолат:L-гомоцистеин
Рабочее название	S-метилтрансфераза
Класс	2. Трансферазы
Подкласс	2.1. Переносящие одноуглеродные фрагменты
Подподкласс	2.1.1. Метилтрансферазы
Классификационный номер	2.1.1.13.
Кофактор	Кобаламин. Цинк.

III класс. Гидролазы

Гидролазы — осуществляют разрыв внутримолекулярных связей в субстрате (за исключением С-С связей) путем присоединения элементов H_2O . Гидролазы подразделяют на 13 подклассов. Коферменты у всех гидролаз отсутствуют.

Ввиду сложности многих субстратов у ряда ферментов сохранены тривиальные названия: пепсин, трипсин, эластаза. Гидролазы сосредоточены в основном в желудочно-кишечном тракте и в лизосомах клеток тканей. Осуществляют распад макромолекул, образуя легко адсорбируемые мономеры. В основные **подклассы** гидролаз выделяют группы ферментов, катализирующих гидролиз:

- 3.1. сложных эфиров;
- 3.2. О-гликозидов;
- 3.3. простых эфиров;
- 3.4. пептидов;
- 3.5. непептидных азот-углеродных связей;
- 3.6. ангидридов кислот;

3.7. углерод-углеродных связей.

Среди *подподклассов* выделяют, например, гидролазы карбоновых кислот (3.1.1.), гидролазы фосфомоноэфиров (3.1.3.).

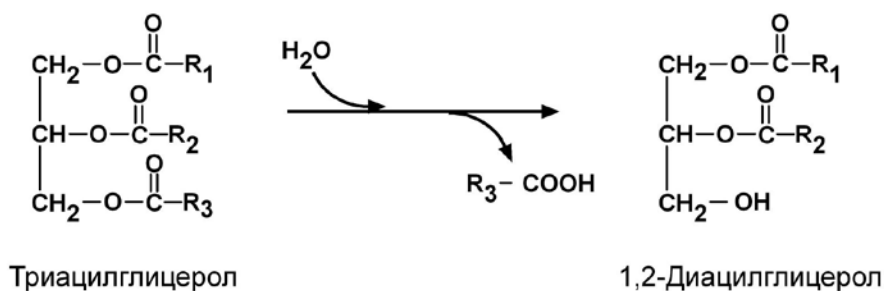
Наиболее часто встречаются следующие гидролазы:

1. **Эстеразы** – гидролиз сложноэфирных связей.
2. **Липазы** – гидролиз нейтральных жиров.
3. **Фосфатазы** – гидролиз моноэфиров фосфорной кислоты.
4. **Гликозидазы** – гидролизуют O- и S-гликозидные связи.
5. **Протеазы, пептидазы** – гидролиз белков и пептидов.
6. **Нуклеазы** – гидролиз нуклеиновых кислот.

Систематическое название гидролаз образуется следующим образом:

Гидролизуемый субстрат : отделяемая группа – гидролаза.

Пример 1



Систематическое название

Рабочее название

Класс

Подкласс

Подподкласс

Классификационный номер

Триацилглицерол:ацилгидролаза

ТАГ-липаза

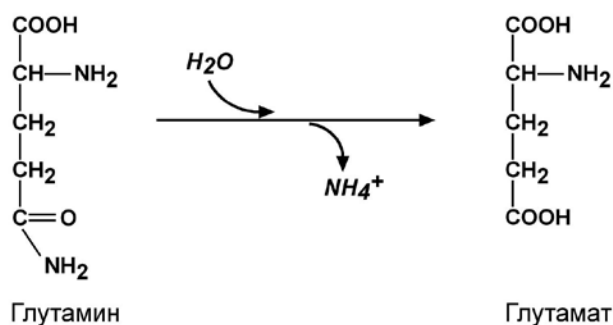
3. Гидролазы

3.1. Действующие на сложные эфиры

3.1.1. Гидролазы карбоновых кислот

КФ 3.1.1.3.

Пример 2



Систематическое название

Рабочее название

Класс

Подкласс

Подподкласс

Классификационный номер

L-глутамин:амидгидролаза

Глутаминаза

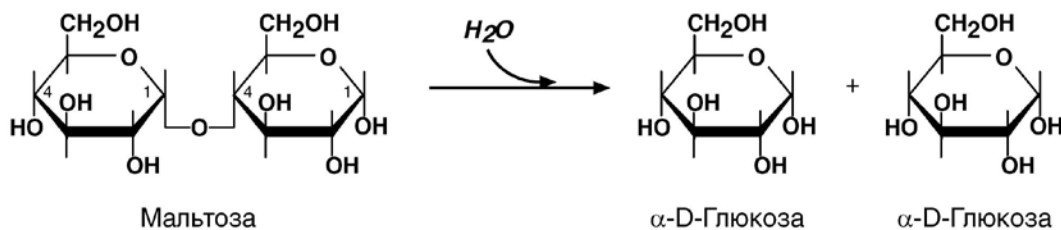
3. Гидролазы

3.5. Действующие на связи углерод-азот
(непептидные)

3.5.1. Действующие в линейных
амидах

КФ 3.5.1.2.

Пример 3



Систематическое название	α-D-глюкозид:глюкогидролаза
Рабочее название	Мальтаза
Класс	3. Гидролазы
Подкласс	3.2. Гликозидазы
Подподкласс	3.2.1. Гидролизующие O-гликозидные связи
Классификационный номер	КФ 3.2.1.20.

IV класс. Лиазы

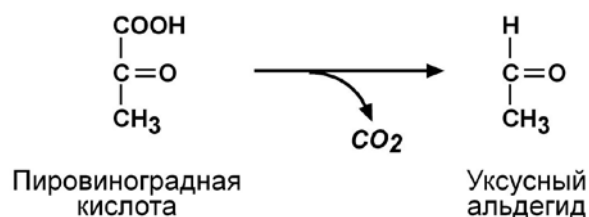
Лиазы – катализируют разрыв C–O, C–C, C–N и других связей, а также обратимые реакции отщепления различных групп субстратов по негидролитическому пути. Класс насчитывает около 230 ферментов. Выделяют 7 подклассов. Реакции сопровождаются образованием двойной связи или присоединением групп к месту двойной связи. Лиазы являются сложными ферментами, коферментами служат пиридоксальфосфат, тиаминдифосфат, магний, кобальт.

На **подклассы** делят в зависимости от природы разрываемой связи:

- 4.1. углерод-углерод лиазы;
- 4.2. углерод-кислород лиазы;
- 4.3. углерод-азот лиазы;
- 4.4. углерод-сера лиазы;
- 4.5. фосфор-кислород лиазы.

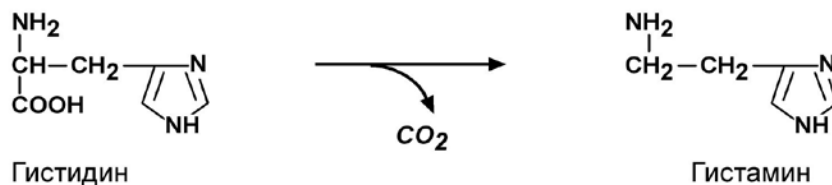
Среди **подподклассов** выделяют, например, карбоксилиазы (4.1.1.), гидролиазы (4.2.1.). Систематическое название ферментов класса лиаз образуют следующим образом: расщепляемый субстрат : отделяемая группа – лиаза.

Пример 1



Систематическое название	2-оксокислота:карбоксилиаза
Рабочее название	Пируватдекарбоксилаза
Класс	4. Лиазы
Подкласс	4.1. Углерод-углерод лиазы
Подподкласс	4.1.1. Карбоксилиазы
Классификационный номер	КФ 4.1.1.1.
Кофермент	Тиаминдифосфат

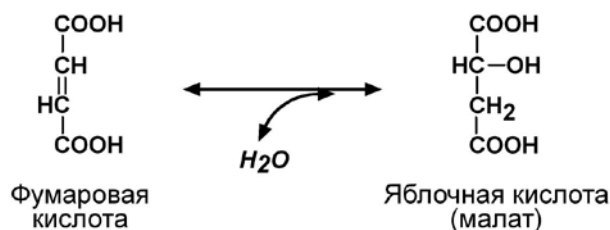
Пример 2



Систематическое название
Рабочее название
Класс
Подкласс
Подподкласс
Классификационный номер
Кофермент

Гистидин:карбоксилиаза
Гистидин-декарбоксилаза
4. Лиазы
4.1. Углерод-кислород лиазы
4.1.1. Карбоксилиазы
КФ 4.1.1.22.
Пиридоксальфосфат

Пример 3



Систематическое название
Рабочее название
Класс
Подкласс
Подподкласс
Классификационный номер

(S)-Малат:гидролиаза
Фумараза
4. Лиазы
4.2. Углерод-кислород лиазы
4.2.1. Гидролиазы
КФ 4.2.1.2.

V класс. Изомеразы

Изомеразы – катализ изомерных превращений в пределах одной молекулы. В классе более 80 ферментов, 6 подклассов. Изомеразы — сложные ферменты, коферментами являются дезоксиаденозилкобаламин, пиридоксальные, пептидные (глутатион), фосфаты моносахаридов (глюкозо-1,6-дифосфат) и др. Изомеразы делят на **подклассы** по типу изомеризации:

5.1. Рацемазы, эпимеразы. Рацемазы — катализ взаимопревращений L-/D-изомеров, S-/R-изомеров. Эпимеразы изменяют конфигурацию при одном из хиральных атомов C: превращения рибулоза ↔ ксилулоза, галактоза ↔ глюкоза, манноза ↔ галактоза, взаимопревращение α-/β-изомеров.

5.2. Цис-транс изомеразы.

5.3. Внутримолекулярные оксидоредуктазы.

5.4. Внутримолекулярные трансферазы – мутазы, осуществляют перенос химических групп внутри молекулы.

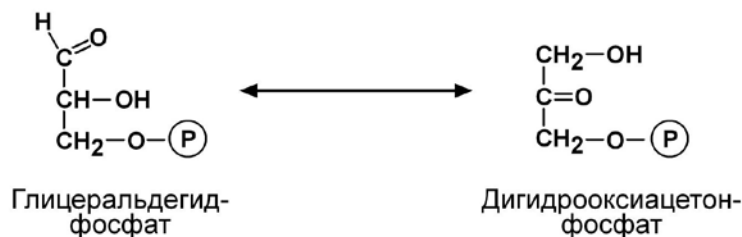
5.5. Внутримолекулярные лиазы.

Среди **подподклассов** выделяют, например: действующие на аминокислоты и их производные (5.1.1.), на углеводы и их производные (5.1.3.), перемещающие двойные (C=C) связи (5.3.3.).

Систематическое название изомераз образуется следующим образом:

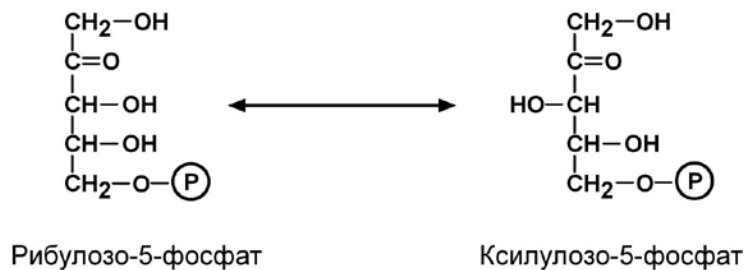
Субстрат – [] – реакция (где [] – обозначение, отражающее суть реакции, например, "номер изменяемого атома углерода", изменение "цис/транс", "кето/енол" или "альдозо/кетозо").

Пример 1



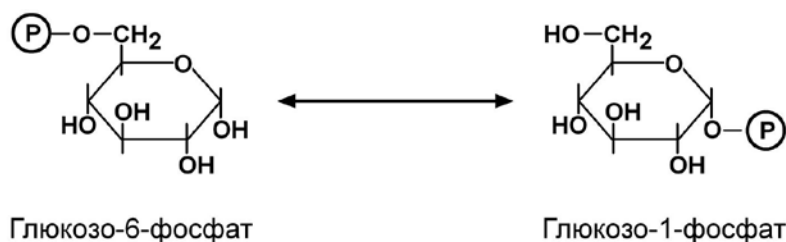
Систематическое название	D-глицеральдегид-3-фосфат-альдозо-кетозо-изомераза
Рабочее название	Триозофосфат-изомераза
Класс	5. Изомеразы
Подкласс	5.3. Внутримолекулярные оксидоредуктазы
Подподкласс	5.3.1. Катализируют взаимопревращения альдоз и кетоз
Классификационный номер	КФ 5.3.1.1.

Пример 2



Систематическое название	D-рибулозо-5-фосфат-3-эпимераза
Рабочее название	Рибулозофосфат-3-эпимераза
Класс	5. Изомеразы
Подкласс	5.1. Рацемазы и эпимеразы
Подподкласс	5.1.3. Действие на углеводы, их производные
Классификационный номер	5.1.3.1.

Пример 3



Систематическое название	α -D-глюкозо-1,6-фосфомутаза
Рабочее название	Фосфоглюкомутаза
Класс	5. Изомеразы
Подкласс	5.4. Внутримолекулярные трансферазы
Подподкласс	5.4.2. Фосфотрансферазы
Классификационный номер	КФ 5.4.2.2.
Кофермент	Глюкозо-1,6-дифосфат

VI класс. Лигазы

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

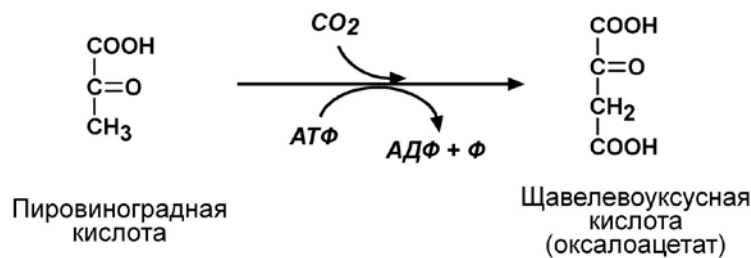
Выделяют 6 **подклассов** ферментов, формирующих связи:

- 6.1. Углерод-кислород.
- 6.2. Углерод-сера.
- 6.3. Углерод-азот.
- 6.4. Углерод-углерод.
- 6.5. Фосфор-кислород.
- 6.6. Азот-металл.

Среди **подподклассов** выделяют, например: образующие связи аминоксил-тРНК (6.1.1.), синтезирующие соединения кислота-тиол (6.2.1.), амиды (6.3.1.). **Систематическое название:**

Субстрат 1 : субстрат 2 – лигаза.

Пример 1



Систематическое название

Рабочее название

Класс

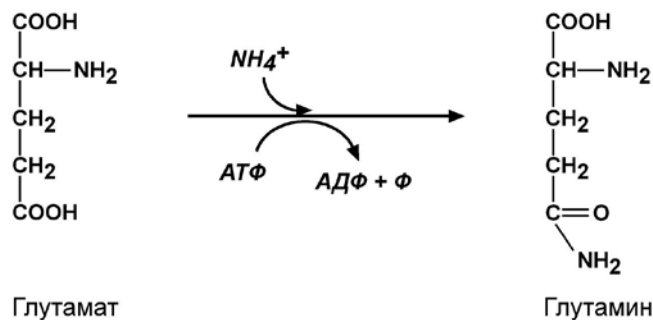
Подкласс

Подподкласс

Классификационный номер

Кофакторы

Пример 2



Систематическое название

Рабочее название

Класс

Подкласс

Подподкласс

Классификационный номер

Пируват : карбоксилигаза (АДФ-образующая)

Пируваткарбоксилаза

6. Лигазы

6.4. Образующие связи углерод-углерод

6.4.1. Образующие связи углерод-углерод

КФ 6.4.1.1.

Биотин. Магний. Цинк.

L-глутамат : аммиак-лигаза

Глутаминсинтетаза

6. Лигазы

6.3. Образующие связи углерод-азот

6.3.1. Амид-синтетазы

КФ 6.3.1.2.

Таблица основных гормонов

1	2	3	4	5	6	7	8
Название и химическая при- рода (формулы – для производных ами- нокислот и холестерина)	Место и реакции синтеза	Место в иерархии гормо-нов: регуляция синтеза и секреции гормона, регуляция действия других гормонов	Органы-мишени	Локализация рецепторов, ме- ханализм действия	Влияние на обмен веществ (углеводный, белковый, ли- пидный, минеральный, вод- ный) и функции организма		Гипо- и гиперфункция

Примечание:

- 1) информацию представить по основным гормонам гипоталамуса, гипофиза, надпочечников и поло-
вых желез, поджелудочной, щитовидной и паращитовидных желез, гормонально активным фор-
мам витамина D₃ (разделы 2,8);
- 2) дополнить графы таблицы по мере изучения частных вопросов биохимии и биохимии полости рта
(разделы 9-12).

ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ БЕЛКИ ПЛАЗМЫ КРОВИ

Фракции белков	Основные представители белковых фракций	Белки острой фазы
Альбумины	Пре- и постальбумины. Альбумин	
	α_1 -Липопротеин α_1 -Кислый серомукоид α_1 -Гликопротеин Транскортин Протромбин Антиплазмин α_1 -Антитрипсин Витамин В ₁₂ -связывающий белок	α_1 -Гликопротеин α_1 -Антитрипсин
	С-реактивный белок Гаптоглобин (Нр-1,Нр-1-2,Нр-2-2) Церулоплазмин α_2 -Липопротеин α_2 -НС-гликопротеин α_2 -Макроглобулин Холинэстераза Щелочная фосфатаза Проакцелерин Фактор Кристмаса	С-реактивный белок α_2 -Макроглобулин Гаптоглобин Церулоплазмин
Глобулины	β_1 А-глобулин β -Липопротеин β_1 В-глобулин Трансферрин Плазминоген Проконвертин Фибриноген Компоненты компле- мента С1-С4, С9 Гемопексин	Трансферрин Компоненты компле- мента С1-С4,С9
	G-иммуноглобулин А-иммуноглобулин D-иммуноглобулин Е-иммуноглобулин М-иммуноглобулин	

Характеристика некоторых белков плазмы крови

Фибриноген

Фибриноген синтезируется в печени. Является белком свертывания крови.

Нормальные величины

Сыворотка 2,0-4,0 г/л

Клинико-диагностическое значение

Повышение концентрации вызывают острые воспалительные процессы и сердечно-сосудистые заболевания (атеросклероз). Снижение - гиперфибринолиз (ДВС-синдром) или наследственная недостаточность.

α_1 -глобулины

Кислый α_1 -гликопротеин

Кислый α_1 -гликопротеин (орозомукоид) обладает кислыми свойствами и содержит много углеводов, имеет высокое сродство к полианионам (например, к гепарину) и, вероятно, регулирует количество свободного гепарина в плазме. α_1 -Гликопротеин связывает лекарства (например, пропранолол, лидокаин), стероиды (прогестерон, тестостерон). Синтезируется в печени.

Нормальные величины

Сыворотка 0,55-1,40 г/л

Клинико-диагностическое значение

Повышение уровня белка в крови отмечается при острых и хронических воспалительных процессах, ревматоидном артрите, злокачественных опухолях, лихорадочных состояниях, травмах, инфаркте миокарда, физической нагрузке, беременности, нефротическом синдроме.

α_1 -Антитрипсин

α_1 -Антитрипсин - гликопротеин, образуется в печени, белок острой фазы, является ингибитором протеиназ (трипсина, химотрипсина, калликреина, плазмина) и обуславливает 92-94% от общей антипротеолитической функции крови. Аутомно-рецессивно наследуемый недостаток его в крови является одним из факторов патогенеза эмфиземы легких, бронхоэктазий и хронического бронхита, ранних циррозов печени. Очевидно, что отсутствие ингибитора приводит к неограниченному протеолизу клеток в зоне воспаления, что удлиняет и углубляет деструктивные процессы в тканях.

Нормальные величины

Сыворотка 2,0-2,4 г/л

Клинико-диагностическое значение

Концентрация в крови возрастает при острых инфекциях, воспалительных процессах, злокачественных образованиях, действии гормонов (беременность, стероидная терапия), системной красной волчанке и злокачественных новообразованиях.

α_1 -Антихимотрипсин

α_1 -Антихимотрипсин является одним из реагирующих первыми белков острой фазы (уровень в сыворотке может удваиваться в течение нескольких часов), выступает слабым специфическим ингибитором химотрипсина, вместе с тем отмечена его активность по отношению и к другим протеазам.

Нормальные величины

Сыворотка 0,3-0,6 г/л

Клинико-диагностическое значение

Увеличение концентрации белка обусловлено острофазовыми реакциями: воспаление, травма после хирургической операции, инфаркт миокарда, бактериальные инфекции.

α_2 -глобулины

С-реактивный белок

С-реактивный белок (СРБ) по происхождению является мезенхимальным белком, который подвергся частичной денатурации вследствие распада тканей при воспалительных и деструктивных процессах. Он участвует в активации классического пути комплемента, иммунных

реакций, является ингибитором агрегации тромбоцитов, связывает липиды, углеводы, участвует в работе каталазы.

Нормальные величины

Сыворотка < 50 мг/л (отсутствие)

Клинико-диагностическое значение

Концентрация этого белка острой фазы быстро повышается в 15-25 раз при острых и хронических инфекциях, некрозе клеток, инфаркте миокарда, ревматоидном артрите, подагре.

Гаптоглобин

Гаптоглобин - белок острой фазы, синтезируется в печени. Обладает следующими функциями: связывает свободный гемоглобин плазмы и предохраняет организм от потери железа, данный комплекс разрушается в клетках РЭС и печени; выполняет неспецифическую защитную функцию, комплексуясь с белковыми и небелковыми веществами, появляющимися при распаде клеток; является естественным ингибитором катепсина В; участвует в транспорте витамина В₁₂. Гаптоглобин в низких концентрациях присутствует во многих жидкостях организма: ликворе, лимфе, синовиальной жидкости, желчи.

Нормальные величины

Сыворотка крови 0,8-2,7 г/л

Клинико-диагностическое значение

Концентрация белка неспецифически повышается в ответ на повреждение ткани, воспаление, опухолевый процесс (особенно с метастазами). Высокие показатели наблюдаются при сахарном диабете, нефротическом синдроме, пиелонефрите, ожогах, острых и хронических воспалительных состояниях, некрозе тканей, инфаркте миокарда, активных аутоиммунных заболеваниях, системных ревматоидных заболеваниях.

Снижение количества белка отмечено при поражении паренхимы печени, гемолитических анемиях. Уровень гаптоглобина считается чувствительным показателем гемолитических состояний: высвобождение гемоглобина вызывает снижение концентрации гаптоглобина.

α₂-Макроглобулин

α₂-Макроглобулин – высокомолекулярный цинксодержащий белок, состоит из 4 идентичных субъединиц и включает углеводный компонент, синтезируется в печени. Является ингибитором протеиназ (как свертывающей системы крови, так и других) – плазмина, пепсина, трипсина, химотрипсина, эндопептидаз, катепсина D, тромбина, калликреина. Транспортирует ферменты и гормоны, рецептор лимфоцитов, участвует во взаимодействии матери и плода, оказывает иммуномодулирующее действие, ингибитор компоненты комплемента.

Нормальные величины

Сыворотка крови мужчины 1,50-3,50 г/л

женщины 1,75-4,20 г/л

Клинико-диагностическое значение

Белок контролирует развитие инфекций и воспалительных процессов. Повышение его уровня выявляется при циррозе печени, остром и хроническом гепатите, беременности, врожденных пороках сердца, эндокринных заболеваниях (сахарный диабет, микседема), бронхопневмонии, нефротическом синдроме.

Снижение – при ревматическом полиартрите, потере белка или недостаточности его в питании, диссеминированном свертывании крови, фибринолитической терапии, остром панкреатите, инфаркте миокарда, язвах желудка и двенадцатиперстной кишки.

Церулоплазмин

Церулоплазмин содержит 8 атомов меди. Это белок острой фазы, регулятор обмена меди в организме (комплексирует 90 % всей меди плазмы) – транспортирует ионы меди из печени в другие органы. Церулоплазмин является оксидазой полифенолов и диаминов, способствует насыщению железом апотрансферрина, участвует в обмене биогенных аминов (адреналина, норадреналина, серотонина) и аскорбиновой кислоты, регулирует уровень симпатических медиаторов мозга; выступая как сывороточный антиоксидант, ликвидирует супероксидные

радикалы кислорода, восстанавливает O₂ до воды и предотвращает окисление ненасыщенных жирных кислот.

Нормальные величины

Сыворотка 0,15-0,50 г/л

Клинико-диагностическое значение

Повышенные результаты определяются при ревматоидном артрите, системной красной волчанке, хронических воспалительных процессах, холестазе, гепатите, циррозе печени, инфаркте миокарда, острых инфекциях, злокачественных новообразованиях с метастазами, при меланоме, шизофрении.

Уменьшение показателя выявлено при снижении синтеза фермента (болезнь Вильсона-Коновалова), повышенной потере (заболевания ЖКТ, нефротический синдром), уменьшении абсорбции в кишечнике (нарушения всасывания, недостаточность питания).

β-глобулины

Семейство трансферринов

К белкам семейства трансферринов принадлежит собственно белок под названием трансферрин, также овотрансферрин, лактоферрин, меланотрансферрин и ряд других.

Белки семейства, связывая ионы железа (III) и препятствуя их восстановлению, представляют собой важный компонент антиоксидантной защиты организма. Связывание железа трансферринами препятствует его использованию микроорганизмами, что обуславливает бактериостатическую активность этих белков.

Трансферрин

Трансферрин синтезируется в печени и ретикулоэндотелиальной системе. Трансферрин транспортирует трехвалентное железо вместе с анионом гидрокарбоната из двенадцатиперстной кишки и селезенки ко всем тканям.

В норме железом насыщено только 1/3 общего количества трансферрина.

Нормальные величины

Сыворотка крови	мужчины	2,1-3,6 г/л
	женщины	2,5-3,8 г/л

Клинико-диагностическое значение

Концентрация повышается при недостатке железа в организме, беременности, приеме эстрогенов, липоидном нефрозе.

Снижение наблюдается при наследственной недостаточности синтеза, приеме тестостерона, нефрозах, малярии, гемохроматозе, недоедании, опухолях.

Лактоферрин

Белок широко представлен в плазме крови, секреторных жидкостях: молоко, слюна, слеза, желчь, секреты носовых и бронхиальных желез.

Главной биологической функцией лактоферрина является связывание и транспорт ионов железа, но также белок обладает широкой антибактериальной, противовирусной и антигрибковой активностью.

Нормальные величины

Сыворотка крови	0,2-0,6 мг/л
Женское молоко	до 7,0 г/л

Клинико-диагностическое значение

Увеличение содержания белка в крови отмечается при беременности, гестозах, кожных заболеваниях, злокачественных новообразованиях ЖКТ.

НОРМАЛЬНЫЕ (РЕФЕРЕНТНЫЕ) ВЕЛИЧИНЫ ИЗУЧЕННЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ

Сыворотка крови

Показатель	Пол, возраст, другое	Нормальные величины	
Амилаза		16-30 г/л·ч	
Активность АЛАТ		0,10-0,68 ммоль/л·ч	
Активность АсАТ		0,10-0,45 ммоль/л·ч	
Коэффициент де Ритиса		1,33±0,40	
Остаточный азот		14,3-28,6 ммоль/л	
Мочевина		2,5-8,3 ммоль/л	
Креатинин	женщины	44-97 мкмоль/л	
	мужчины	52-132 мкмоль/л	
Мочевая кислота	Обычная диета	0,12-0,32 ммоль/л	
	Мясная диета	0,16-0,45 ммоль/л	
Белок общий	Взрослые	65-85 г/л	
Фракции белков			
альбумины	30-50 г/л	50-70 %	
α_1 -глобулины	1-3 г/л	3-6 %	
α_2 -глобулины	6-10 г/л	9-15 %	
β -глобулины	7-11 г/л	8-18 %	
γ -глобулины	8-16 г/л	15-25 %	
Коэффициент альбумины/глобулины		1,2-1,8	
Коэффициент альбумины/ $(\alpha_1 + \alpha_2$ -глобулины)		3,9-6,1	
Проба Вельтмана		0,4-0,5 мл р-ра CaCl_2	
Тимоловая проба		0-4 ед. S-H	
Глюкоза		3,3-5,8 ммоль/л	
Тест толерантности к глюкозе	Натощак	3,3-5,8 ммоль/л	100 %
	Через 60 мин	6,7-9,4 ммоль/л	150-175 %
	Через 120 мин	ниже 6,7 ммоль/л	около 100 %
Коэффициент Бодуэна		около 50 %	
Коэффициент Рафальского		0,9-1,04	
Триацилглицеролы	20-29	0,5-2,1 ммоль/л	
	30-39	0,5-3,2 ммоль/л	
	40-49	0,6-3,4 ммоль/л	
	50-59	0,6-3,4 ммоль/л	
Холестерол общий	20-29 лет	3,70-6,51 ммоль/л	
	30-39 лет	4,25-7,04 ммоль/л	
	40-49 лет	4,37-7,70 ммоль/л	
	старше 50 лет	4,55-8,24 ммоль/л	
Гемоглобин	женщины	120-140 г/л	
	мужчины	130--60 г/л	
Общий билирубин		3,4-17,1 мкмоль/л	
Прямой билирубин		2,2-5,1 мкмоль/л	

Калий		3,5-5,1 ммоль/л
Натрий		136-146 ммоль/л
Железо	мужчины	8,9-28,6 мкмоль/л
	женщины	7,1-26,8 мкмоль/л
Фосфаты		0,81-1,48 ммоль/л
Кальций		2,0-2,6 ммоль/л
Хлориды		97-108 ммоль/л
рН	артериальная кровь	7,37-7,45
	венозная кровь	7,34-7,43
рСО ₂	мужчины	35-48 мм рт.ст. или 4,66-6,38 кПа
	женщины	32-45 мм рт.ст. или 4,26-6,00 кПа
Буферные основания		44-48 ммоль/л
Бикарбонаты	артериальная кровь	21-28 ммоль/л
	венозная кровь	22-29 ммоль/л
Остаточные анионы		12 ммоль/л
Избыток буферных оснований		от -2 до +3 ммоль/л
рО ₂		83-108 мм рт.ст. или 11,04-14,36 кПа
Оксигемоглобин (HbO ₂)		94-97 %
Насыщение гемоглобина кислородом (HbO _{SAT})		94-98 %

Моча

Амилаза		28-160 г/л·ч
Мочевина		330-580 ммоль/сут
Креатинин		4,4-17,7 ммоль/сут
Мочевая кислота	обычная диета	1,46-4,43 ммоль/сут
	мясная диета	2,36-5,90 ммоль/сут
Белок		50-150 мг/сут
Глюкоза		0,06-0,83 ммоль/л или до 0,5 %
рН		5,0-6,5
удельный вес		1008-1026
Фосфаты		25,8-48,4 ммоль/сут
Кальций		2,5-7,5 ммоль/сут
Хлориды		120-240 ммоль/сут

Клиренс эндогенного креатинина

	Мужчины	Женщины
до 1 года	65-100 мл/мин	65-100 мл/мин
от 1 до 30 лет	88-146 мл/мин	81-134 мл/мин
от 30 до 40 лет	82-140 мл/мин	75-128 мл/мин
от 40 до 50 лет	75-133 мл/мин	69-122 мл/мин
от 50 до 60 лет	68-126 мл/мин	64-116 мл/мин
от 60 до 70 лет	61-120 мл/мин	58-110 мл/мин
старше 70 лет	55-113 мл/мин	52-105 мл/мин

Желудочный сок

Соляная кислота	Общая кислотность	40-60 ммоль/л
	Свободная HCl	20-40 ммоль/л
	Связанная HCl	10-20 ммоль/л

Ротовая жидкость

Показатель pH	6,3-7,4
Общий белок	2-3 г/л
Ионы кальция	2,1-2,3 ммоль/л
Ионы фосфатов	5,0-5,6 ммоль/л
Фториды	0,06-1,8 мг/л

Понятие нормальной (референтной) величины

“Истинно нормальными” величинами лабораторных показателей считают величины, обнаруженные у тщательно обследованной достаточно большой группы лиц в возрасте 20-30 лет без объективных признаков патологии. Поскольку термин “нормальные величины” труден для толкования, было предложено заменить его понятием “референтные величины”, т.е. величины для сравнения (справочные величины). Обычно приводят референтный интервал, ограниченный двумя величинами, между которыми располагается ряд, который включает центральные 95 % величин. При этом по 2,5 % величин с каждой стороны ряда исключаются и отбрасываются. Референтный интервал выводят при обследовании не менее 120 человек. Если результаты лабораторного исследования подчиняются закону нормального распределения, то для их статистической обработки могут применяться параметрические критерии статистики, например тест Стьюдента для оценки достоверности различий или среднее квадратическое отклонение при оценке разброса результатов. Нормальное распределение всегда предусматривает в интервалах $\bar{X} \pm S$ определенный процент значений. Так, 68,3 % результатов лежит в пределах $\bar{X} \pm 1S$, 95,5 % - в пределах $\bar{X} \pm 2S$ и 99,7 % - в пределах $\bar{X} \pm 3S$. Если распределение не является нормальным или вид распределения определить невозможно из-за малого числа наблюдений (менее 30), то рекомендуют применять непараметрические критерии статистики. Для всех показателей привести унифицированные референтные величины пока невозможно из-за недостаточной унификации методов лабораторного исследования и обработки полученных результатов. Поэтому в ряде случаев указывают средние величины и средние квадратические отклонения.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
Список сокращений	4
<i>Раздел 1. Строение, свойства, функции белков и нуклеиновых кислот</i>	<i>6</i>
<i>ТЕМА 1.1. Строение, классификация и роль аминокислот. Структура молекул белка</i>	<i>6</i>
<i>ТЕМА 1.2. Состав и свойства белков. Методы очистки и исследования белков</i>	<i>10</i>
<i>ТЕМА 1.3. Классификация, функции белков. Простые и сложные белки</i>	<i>14</i>
<i>ТЕМА 1.4. Нуклеотиды, нуклеиновые кислоты, нуклеопротеины: структура, свойства, функции</i>	<i>17</i>
<i>Раздел 2. Строение, свойства, функции ферментов и витаминов</i>	<i>23</i>
<i>ТЕМА 2.1. Строение, свойства, классификация ферментов</i>	<i>23</i>
<i>ТЕМА 2.2. Строение, классификация и роль витаминов</i>	<i>28</i>
<i>ТЕМА Белки. Нуклеиновые кислоты. Ферменты. Витамины (контрольное занятие по разделам 1 и 2)</i>	<i>35</i>
<i>Раздел 3. Введение в обмен веществ и энергии. Биологическое окисление</i>	<i>37</i>
<i>ТЕМА 3.1. Введение в обмен веществ и энергии. Общие пути катаболизма и окислительное фосфорилирование (семинар)</i>	<i>37</i>
<i>Раздел 4. Строение, функции, обмен углеводов</i>	<i>41</i>
<i>ТЕМА 4.1. Строение, внешний обмен, депонирование углеводов</i>	<i>41</i>
<i>ТЕМА 4.2. Анаэробный и аэробный обмен углеводов</i>	<i>44</i>
<i>Раздел 5. Строение, функции, обмен липидов</i>	<i>54</i>
<i>ТЕМА 5.1. Строение, функции, внешний обмен, депонирование липидов</i>	<i>54</i>
<i>ТЕМА 5.2. Транспорт и внутриклеточный обмен простых и сложных липидов</i>	<i>57</i>
<i>ТЕМА Обмен углеводов и липидов. Биоэнергетика (контрольное занятие по разделам 3, 4 и 5)</i>	<i>65</i>
<i>Раздел 6. Обмен белков и нуклеиновых кислот. Матричные биосинтезы</i>	<i>68</i>
<i>ТЕМА 6.1. Внешний обмен белков, гниение в кишечнике и детоксикация в печени</i>	<i>68</i>
<i>ТЕМА 6.2. Общие и частные пути метаболизма аминокислот</i>	<i>74</i>
<i>ТЕМА 6.3. Обезвреживание аммиака в организме</i>	<i>79</i>
<i>Раздел 7. Обмен нуклеотидов, нуклеопротеинов. Матричные биосинтезы</i>	<i>84</i>
<i>ТЕМА 7.1. Обмен нуклеотидов, нуклеопротеинов</i>	<i>84</i>
<i>ТЕМА 7.2. Биосинтез белка и его регуляция</i>	<i>87</i>
<i>ТЕМА Обмен белков и нуклеиновых кислот. Матричные биосинтезы (контрольное занятие по разделам 6 и 7)</i>	<i>96</i>
<i>Раздел 8. Регуляция обмена веществ. Регуляторные молекулы и клеточная мембрана</i>	<i>98</i>
<i>ТЕМА 8.1. Иерархия систем регуляции. Гормоны</i>	<i>98</i>
<i>ТЕМА 8.2. Строение и роль биомембран. Механизмы транспорта и рецепции (семинар)</i>	<i>102</i>
<i>Раздел 9. Нервная и мышечная ткани. Медиаторы</i>	<i>106</i>
<i>ТЕМА 9.1. Нервная и мышечная ткани. Медиаторы</i>	<i>106</i>
<i>ТЕМА Системы регуляции и биомембраны. Гормоны и медиаторы (контрольное занятие по разделам 8 и 9)</i>	<i>112</i>
<i>Раздел 10. Соединительная, костная и зубные ткани</i>	<i>115</i>
<i>ТЕМА 10.1. Соединительная ткань. Пульпа зуба</i>	<i>115</i>
<i>ТЕМА 10.2. Костная ткань. Твёрдые ткани зуба. Минерализация</i>	<i>122</i>
<i>ТЕМА Соединительная, костная и зубные ткани (контрольное занятие по разделу 10)</i>	<i>142</i>
<i>Раздел 11. Кровь. Моча</i>	<i>144</i>
<i>ТЕМА 11.1. Белки, ферменты, азотсодержащие вещества крови</i>	<i>144</i>

ТЕМА 11.2. Эритроцит. Обмен железа и гемопротеинов	152
ТЕМА 11.3. Неорганические вещества крови. Кислотно-основное состояние	158
ТЕМА 11.4. Водно-солевой обмен. Нормальные и патологические компоненты мочи	163
Раздел 12. Ротовая жидкость. Десневая жидкость и пародонт	174
ТЕМА 12.1. Ротовая жидкость. Десневая жидкость и пародонт	174
ТЕМА Кровь, моча и почки. Жидкости полости рта и пародонт (<i>контрольное занятие по разделам 11 и 12</i>)	191
Экзаменационные вопросы	195
Ответы на тестовые задания и ситуационные задачи	204
Рекомендуемая литература	211
Приложения	212

Практическое издание

Авторы

Татьяна Васильевна Жаворонок
Олег Алексеевич Тимин

**ПРАКТИКУМ
ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ
И БИОХИМИИ ПОЛОСТИ РТА**

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

Подписано в печать 15.09.16
Формат 60x84_{1/8} Бумага офсетная.
Печать ризограф. Гарнитура «Times». Печ. лист. 29
Тираж 100 экз. Заказ №

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