

Государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
"Сибирский государственный медицинский университет"
Министерства здравоохранения и социального развития
Российской Федерации

ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ

**ДЛЯ СТУДЕНТОВ
ЛЕЧЕБНОГО И ПЕДИАТРИЧЕСКОГО
ФАКУЛЬТЕТОВ**

Учебное пособие

Томск
Сибирский государственный медицинский университет
2012

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

Авторы

Тимин О.А., Степовая Е.А., Федорова Т.С., Носарева О.Л., Серебров В.Ю.

Л125 Лабораторный практикум по биологической химии для студентов лечебного и педиатрического факультетов: учебное пособие / О.А. Тимин, Е.А. Степовая, Т.С. Федорова, О.Л. Носарева, В.Ю. Серебров – Томск: Сибирский государственный медицинский университет, 2012 – 250 с.

ISBN 978-598591-074-2

Данное пособие написано в соответствии с программой по биологической химии для студентов медицинских вузов. В каждом разделе приведены лабораторные работы и биохимические методы, выполняемые студентами на практических занятиях. Ряд изучаемых методов используется в клинко-диагностических лабораториях для помощи лечащему врачу в постановке диагноза и для контроля эффективности лечения.

По каждому разделу студенту предлагаются вопросы для самоподготовки к практическому занятию, тестовые задания и ситуационные задачи для проверки полученных знаний.

Пособие предназначено для студентов, обучающихся по специальностям 060101 "Лечебное дело" и 060103 "Педиатрия".

Рецензенты:

Заведующий кафедрой биологической химии Новосибирского государственного медицинского университета, д-р мед. наук, профессор **Шарапов В.И.**

Заведующий кафедрой биохимии Челябинской государственной медицинской академии, д-р биол. наук, профессор **Цейликман В.Э.**

Учебное пособие утверждено и рекомендовано к печати: учебно-методической комиссией медико-биологического факультета (протокол № 2 от 22 марта 2011 г) и Центральным методическим советом ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России (протокол № 2 от 19 мая 2011г).

ISBN 978-598591-074-2

© Сибирский государственный медицинский университет, 2012

© Тимин О.А., Степовая Е.А.,
Федорова Т.С., Носарева О.Л.,
Серебров В.Ю. 2012

ОГЛАВЛЕНИЕ

Раздел 1. Строение, свойства и функции белков	5
Тема 1.1. Строение и классификация аминокислот. Структура белков.....	5
Тема 1.2. Структура и физико-химические свойства белков.....	10
Тема 1.3. Классификация белков. Строение и функции белков в организме. Сложные белки.....	14
Тестовые задания.....	18
Ситуационные задачи.....	19
Раздел 2. Строение, классификация и роль витаминов	21
Тема 2.1. Жирорастворимые витамины.....	21
Тема 2.2. Водорастворимые витамины.....	25
Тестовые задания.....	32
Ситуационные задачи.....	33
Раздел 3. Энзимология	34
Тема 3.1. Строение и свойства ферментов. Использование ферментов в медицине.....	34
Тема 3.2. Регуляция активности ферментов.....	42
Тема 3.3. Классификация и номенклатура ферментов (семинар).....	45
Тестовые задания.....	46
Ситуационные задачи.....	47
Контрольные вопросы к итоговому занятию	49
Раздел 4. Биологическое окисление	52
Тема 4.1. Общие пути катаболизма: окислительное декарбоксилирование пирувата. Цикл трикарбоновых кислот. Ферменты дыхательной цепи. Окислительное фосфорилирование (семинар).....	52
Тестовые задания.....	54
Ситуационные задачи.....	55
Раздел 5. Обмен аминокислот и белков	56
Тема 5.1. Внешний обмен белков.....	56
Тема 5.2. Внутриклеточный обмен аминокислот.....	65
Тема 5.3. Пути превращения аммиака и его обезвреживание.....	69
Тема 5.4. Особенности и нарушения обмена некоторых аминокислот.....	74
Тестовые задания.....	79
Ситуационные задачи.....	80
Раздел 6. Строение и обмен пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов	81
Тема 6.1. Строение и метаболизм пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов.....	81
Тестовые задания.....	86
Ситуационные задачи.....	88
Раздел 7. Матричные биосинтезы	89
Тема 7.1. Синтез нуклеиновых кислот и его регуляция.....	89
Тема 7.2. Биосинтез белка и его регуляция.....	92
Тестовые задания.....	98
Ситуационные задачи.....	99

Контрольные вопросы к итоговому занятию.....	101
Раздел 8. Строение и обмен углеводов.....	105
Тема 8.1. Строение и внешний обмен углеводов. Обмен гликогена.....	105
Тема 8.2. Окисление глюкозы в анаэробных условиях. Глюконеогенез.....	110
Тема 8.3. Аэробное окисление глюкозы. Пентозофосфатный путь.....	117
Тестовые задания.....	123
Ситуационные задачи.....	125
Контрольные вопросы к итоговому занятию.....	126
Раздел 9. Строение и обмен липидов.....	129
Тема 9.1. Строение и внешний обмен липидов.....	129
Тема 9.2. Внутриклеточный обмен жирных кислот и триацилглицеролов.....	134
Тема 9.3. Внутриклеточный обмен фосфолипидов и холестерина. Транспорт липидов в крови.....	141
Тестовые задания.....	144
Ситуационные задачи.....	146
Контрольные вопросы к итоговому занятию.....	147
Раздел 10. Гормональная регуляция обмена веществ и функций организма.....	151
Тема 10.1. Механизмы передачи гормонального сигнала. Классификация гормонов. Гормоны гипофиза. (семинар).....	151
Тема 10.2. Гормоны гипоталамуса, гипофиза, щитовидной и паращитовидной желез.....	153
Тема 10.3. Гормоны гипофиза, надпочечников и половых желез.....	158
Тестовые задания.....	161
Ситуационные задачи.....	163
Раздел 11. Биохимия крови.....	164
Тема 11.1. Азотсодержащие вещества крови: белки, ферменты, фракции остаточного азота.....	164
Тема 11.2. Обмен железа. Гемопротейны. Синтез и распад гема.....	175
Тема 11.3. Неорганические вещества крови. Кислотно-основное состояние.....	183
Тестовые задания.....	194
Ситуационные задачи.....	196
Раздел 12. Биохимия почек и печени.....	197
Тема 12.1. Водно-солевой обмен. Нормальные и патологические компоненты мочи.....	197
Тема 12.2. Участие печени в метаболизме веществ. Биотрансформация ксенобиотиков.....	207
Тестовые задания.....	211
Ситуационные задачи.....	212
Контрольные вопросы к итоговому занятию.....	213
Приложение 1	218
Классификация и номенклатура ферментов.....	218
Приложение 2	232
Индивидуальные белки плазмы крови.....	232
Приложение 3	238
Приложение 4	242

РАЗДЕЛ 1

СТРОЕНИЕ, СВОЙСТВА И ФУНКЦИИ БЕЛКОВ

ТЕМА 1.1. СТРОЕНИЕ И КЛАССИФИКАЦИЯ АМИНОКИСЛОТ. СТРУКТУРА БЕЛКОВ

АКТУАЛЬНОСТЬ

Аминокислоты являются материалом для строительства белков – пластического материала клеток живого организма. Особенности аминокислотного состава обусловлено огромное разнообразие структуры и функций белковых молекул, благодаря чему белкам принадлежит ведущая роль во всех процессах жизнедеятельности. Аминокислоты участвуют в образовании биогенных аминов, азотистых оснований и мононуклеотидов, нейромедиаторов и т.д. Ряд из них используются в качестве лекарств.

ЦЕЛЬ

Знакомство со строением, физико-химическими свойствами и классификацией аминокислот, входящих в состав белков организма человека.

Приобретение практических навыков по проведению качественного анализа биологических жидкостей на присутствие аминокислот, пептидов и белков при помощи цветных реакций.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Принципы классификации аминокислот.
2. Классы аминокислот:
 - по биологической роли (заменяемые и незаменимые);
 - по физико-химическим свойствам (нейтральные, кислые, основные; гидрофобные, гидрофильные);
 - по химическому строению (с алифатическими радикалами, с дополнительной функциональной группой, с ароматическим и гетероциклическим радикалом, иминокислоты);
 - по растворимости в воде (неполярные, полярные незаряженные, полярные отрицательно и положительно заряженные).
3. Структурные формулы протеиногенных аминокислот.
4. Физико-химические свойства аминокислот, роль их функциональных групп.
5. Изoeлектрическая точка аминокислот и пептидов. От чего она зависит?
6. Влияние изменения pH на заряд аминокислот.
7. Пептидная связь, реакция образования. Свойства пептидной связи.

8. Влияние изменения рН на заряд и растворимость пептидов.
9. Цветные качественные реакции на аминокислоты и белки. Принцип методов. Практическое применение реакций.
10. Обнаружение белка и свободных аминокислот в биологическом материале. Ключевые моменты анализа. Как удалить белок из биологической жидкости? Как обнаружить наличие свободных аминокислот в жидкости?

Лабораторная работа 1

ЦВЕТНЫЕ КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА БЕЛОК И АМИНОКИСЛОТЫ

Реактивы

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

Материал исследования

При изучении цветных реакций в качестве объекта исследования используют 1% водный раствор яичного белка, содержащего полный набор аминокислот.

РЕАКЦИЯ НА ПЕПТИДНУЮ СВЯЗЬ

Для обнаружения пептидной связи в белках и пептидах используется универсальная **биуретовая реакция**. Биуретовую реакцию дают вещества, содержащие не менее двух пептидных группировок.

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. Интенсивность окрашивания пропорциональна количеству пептидных групп.

Проведение анализа

В пробирку с 5 каплями 1% раствора белка вносят 3 капли 10% раствора NaOH и 1 каплю 5% раствора $CuSO_4$.

РЕАКЦИЯ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ α -АМИНОГРУПП

Для обнаружения α -аминогрупп, содержащихся в аминокислотах, и концевых α -аминогрупп пептидов и белков используется **нингидриновая реакция**.

Принцип

При нагревании аминокислот и пептидов с нингидрином происходит окислительное отщепление α -аминогрупп и восстановление нингидрина. Восстановленный нингидрин реагирует с

аммиаком и другой молекулой окисленного нингидрина с образованием комплекса сине-фиолетового цвета.

Проведение анализа

5 капель раствора белка смешивают с 5 каплями 0,5% раствора нингидрина. Пробирки нагревают и кипятят до появления сине-фиолетового окрашивания.

РЕАКЦИЯ НА АРОМАТИЧЕСКИЕ АМИНОКИСЛОТЫ

Для обнаружения ароматических аминокислот (фенилаланин, тирозин, триптофан) используется **ксантопротеиновая реакция**.

Принцип

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

Проведение анализа

К 5 каплям 1% раствора белка добавляют 2 капли конц. HNO_3 и осторожно нагревают. Наблюдают за появлением желтого окрашивания, при отсутствии желтого цвета еще добавляют 1-2 капли конц. HNO_3 . При добавлении избытка 30% раствора NaOH окраска переходит в оранжевую.

РЕАКЦИИ НА СЕРОСОДЕРЖАЩИЕ АМИНОКИСЛОТЫ

Принцип

Сульфгидрильные группы в белке или пептиде подвергаются щелочному гидролизу, в результате чего происходит отщепление серы в виде сульфида натрия Na_2S , который вступает в дальнейшие реакции:

- **реакция Фоля** – Na_2S с ацетатом свинца $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ дает черный или бурый осадок сульфида свинца;
- **реакция с нитропруссидом** – Na_2S дает с нитропруссидом натрия соединение, окрашенное в красно-коричневый цвет.

Проведение анализа

5 капель 1% раствора белка и 5 капель 30% раствора NaOH кипятить 1-2 минуты. Разделить содержимое на 2 части для реакций "а" и "б".

а) Реакция Фоля

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

б) Реакция с нитропруссидом

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

Практическое значение цветных реакций

Цветные реакции, являясь универсальными (биуретовая, нингидриновая) и специфическими (реакция Фоля, ксантопротеиновая), позволяют установить белковую природу вещества, обнаружить белок и аминокислоты в растворе, изучить состав белков и пептидов.

Принцип этих реакций используется для количественного определения аминокислот и белков в биологических жидкостях.

Оформление работы

Результаты оформляют в виде таблицы, где отмечают полученный цвет раствора и интенсивность окраски. Интенсивность окраски обозначают следующим образом: “–” отсутствие окраски; “+” слабая окраска; “++” сильная окраска; “+++” очень сильная окраска.

Объект исследования	Реакции				
	Биуретовая	Нингидриновая	Ксантопротеиновая	Фоля	С нитропруссидом
Раствор яичного белка					

В выводах указывается на возможность обнаружения пептидных связей и некоторых типов аминокислот при помощи используемых реакций.

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 исследования

Сыворотка крови, слюна, моча.

Реактивы

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

Проведение анализа

С 5 каплями сыворотки, слюны и мочи проводят биуретовую реакцию (см. "Лабораторная работа 1"), определяя наличие или отсутствие белка в пробах.

Дальнейшие действия зависят от наличия или отсутствия белка в пробах:

- если жидкость не содержит белок, то с 10 каплями исследуемого материала проводят нингидриновую реакцию (см. "Лабораторная работа 1") для определения наличия или отсутствия α -аминокислот;
- если в жидкости присутствует белок, то для последующего исследования берут 20 капель биологической жидкости, в нее добавляют 5 капель 10% раствора ТХУ и нагревают до осаждения белка. Белок отделяют центрифугированием или фильтрованием через бумажный фильтр (предварительно смочив фильтр водой).

Далее в безбелковой надсадке (или фильтрате) с помощью нингидриновой реакции определяют наличие или отсутствие α -аминокислот. Для этого к нему добавляют 5 капель 0,5% р-ра нингидрина и нагревают в кипящей водяной бане.

Оформление работы

Результаты анализа вносят в таблицу. Знаками "+" и "-" отмечают результаты наблюдения.

Делают вывод о содержании белка и аминокислот в биологических жидкостях и его причинах.

Объект исследования	Обнаруженные соединения	
	Белок	Свободные аминокислоты
Сыворотка крови Слюна Моча		

Практическое значение

Свойство биологических жидкостей изменять свой состав при патологии нашло применение в клинико-диагностических лабораториях для диагностики заболеваний и контроля лечения. Многие методы определения веществ требуют наличия безбелковой жидкости, поэтому они начинаются с удаления белка из раствора путем фильтрации или центрифугирования.

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

ТЕМА 1.2. СТРУКТУРА И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ

АКТУАЛЬНОСТЬ

Выделение белков из раствора (в том числе высаливание и денатурация) широко используется в медицине для диагностических целей, получения и очистки белковых лекарственных препаратов, в экспериментальных исследованиях.

ЦЕЛЬ

Изучить физико-химические свойства белков (молекулярная масса, форма, ионизация, гидратация, растворимость) и основные типы структур белковых молекул.

Научиться осаждать белки из раствора разными методами и использовать способность к осаждению белков в лабораторной практике.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Строение протеиногенных аминокислот. Образование пептидной связи в пептидах и белках.
2. Уровни организации структуры белковых молекул (первичная, вторичная, третичная, четвертичная).
3. Связи, участвующие в формировании уровней структуры белка. Функциональные группы аминокислот, ответственные за образование этих связей.
4. Четвертичная структура белков. Что такое комплементарность протомеров? В чем заключаются кооперативные изменения конформации протомеров?
5. Свойства белков: амфотерность, ионизация (заряд), гидратация, растворимость. Что такое изоэлектрическая точка?
6. Молекулярная масса пептидов и белков. Способы ее определения (ультрацентрифугирование, гель-фильтрация).
7. Свойства белковых растворов. Факторы, стабилизирующие белковую молекулу в растворе. Коллоидные свойства белков.
8. Денатурация белков. Факторы, вызывающие денатурацию белков (физические, химические, биологические). Свойства денатурированного белка.
9. Ренативация белка, ее механизмы.
10. Способы удаления белков из раствора: осаждение кислотами, тяжелыми металлами, органическими растворителями. Принцип реакций осаждения белка.
11. Способы очистки белковых растворов от примесей (высаливание, гель-фильтрация, диализ). Принцип методов.

ТЕМЫ ДЛЯ РЕФЕРАТИВНЫХ СООБЩЕНИЙ

1. Хроматография белков, ее виды, практическое применение.
2. Первая медицинская и первая врачебная помощь при отравлении органическими и неорганическими кислотами, солями тяжелых металлов. Биохимические основы.

3. Использование диализа и плазмафереза в клинической практике: принцип методов, эффективность и область применения.

Лабораторная работа 1

ВЫСАЛИВАНИЕ БЕЛКОВ

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

Реактивы

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

Материал исследования

Сыворотка крови.

Принцип

Под действием нейтральных солей, солей щелочных и щелочно-земельных металлов происходят нейтрализация заряда белковых частиц и их дегидратация. Благодаря этому, используя разные концентрации солей, можно разделить белки сыворотки крови на фракции, т.е. осадить одни белки, сохраняя другие в растворенном состоянии. При растворении осажденного белка в воде происходит восстановление его исходных физико-химических и биологических свойств.

Проведение анализа

К 2 мл сыворотки крови добавляют 2 мл насыщенного раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, при этом получается полунасыщенный раствор. Перемешивают и отмечают выпадение осадка глобулинов.

Через 5 минут осадок отделяют центрифугированием или фильтрованием. Надосадочную жидкость (фильтрат) отделяют. Наличие белка в осадке (на фильтре) доказывают биуретовой реакцией (см Тема 1.1.).

Из надосадка (фильтрата) берут 10 капель и проводят биуретовую реакцию, доказывая наличие белка в растворе. К оставшейся части надосадка добавляют порошок сульфата аммония до полного насыщения, при этом выпадает осадок альбуминов.

Через 5 минут осадок отделяют центрифугированием или фильтрованием. Надосадочную жидкость отделяют и проводят с ней биуретовую реакцию, подтверждая удаление белка из раствора.

Осадок делят на две части. Наличие белка в осадке (на фильтре) доказывают биуретовой реакцией (см Тема 1.1.). Обратимость осаждения проверяют, добавляя к другой части осадка дистиллированную воду.

Клинико-диагностическое значение

Метод высаливания ранее использовали в лабораторной практике для разделения альбуминов и глобулинов, определения их соотношения в сыворотке крови. В норме отношение альбумины/глобулины в сыворотке крови человека колеблется в пределах 1,2-1,8 и при патологии может изменяться в сторону повышения или снижения. Например, при воспалительных заболеваниях увеличивается содержание глобулинов.

Оформление работы

Отмечают принцип метода, ход работы, регистрируют результаты анализа и делают вывод о возможности разделения альбуминов и глобулинов данным методом.

Лабораторная работа 2

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕНАТУРАЦИИ БЕЛКОВ

Денатурация белков – это изменение структурной организации белковой молекулы (четвертичной, третичной и вторичной структуры), приводящее к изменению физико-химических и биологических свойств белка. Денатурирующие факторы делятся на химические (кислоты, тяжелые металлы), физические (ультразвук, высокая и низкая температуры).

Реактивы

1) 1% и 10% р-р CH_3COOH , 2) ацетон, 3) 10% р-р ТХУ, 4) конц. HNO_3 , 5) 1% р-р CuSO_4 , 6) конц. H_2SO_4 , 7) 5% р-р $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 8) танин, 9) 20% р-р сульфосалициловой кислоты, 10) 10% р-р NaOH , 11) насыщенный р-р NaCl .

Материал исследования

Яичный белок, 1% водный раствор.

Принцип

Денатурация снижает заряд и гидратную оболочку белков, соответственно, гидрофильность и устойчивость их в растворе.

Исследование химической денатурации

Проведение анализа

В ряд пронумерованных пробирок вносят по 5 капель 1% раствора яичного белка и добавляют реактивы, пользуясь указаниями таблицы. Знаками "+" и "-" отмечают результаты наблюдения. Интенсивность денатурации указывают числом знаков "+".

Необратимость или обратимость осаждения белка устанавливают добавлением к осадку 20-30 капель дистиллированной воды.

№ проб	Используемые реактивы	Число капель	Механизм и особенности реакции	Результат
Денатурация солями тяжелых металлов				

№ проб	Используемые реактивы	Число капель	Механизм и особенности реакции	Результат
1 2	Меди сульфат Свинца ацетат	2 2	Ионы металлов связываются с заряженными группами аминокислот, в результате чего изменяется пространственная структура белка	
Денатурация концентрированными минеральными кислотами				
3 4	Азотная Серная	2 2	Концентрированные кислоты вызывают дегидратацию белков, нейтрализуют заряд белка, связываясь с катионными группами	
5 6	Азотная Серная	10 10	Исчезновение осадка белка при добавлении избытка серной кислоты обусловлено перезарядкой ионных групп	
Денатурация органическими кислотами				
7	Трихлоруксусная	2	Кислоты нейтрализуют заряд белка, разрушают систему водородных связей и образуют комплексы с белком	
8	Сульфосалициловая	2		
Денатурация дубильными веществами				
9	Танин	2	Образуются нерастворимые солеобразные соединения с аминогруппами основных аминокислот	
Денатурация органическими растворителями				
10	Ацетон	5	Нарушаются гидрофобные взаимодействия внутри белковой молекулы	

Практическое значение

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

В лечебной деятельности их используют при лечении и для профилактики отравлений солями тяжелых металлов в быту и на производстве; для обезвреживания отходов в санитарной практике; для дезинфекции кожи и слизистых.

Оформление работы

Отмечают принцип метода, ход работы, регистрируют механизм осаждения и результаты анализа в таблице. Делают вывод о наиболее эффективном способе осаждения белков.

Исследование денатурации белков при нагревании в условиях различной pH

Проведение анализа

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

Нагревают 1-ю пробу и наблюдают помутнение раствора вследствие термической денатурации.

Во 2-ю пробу добавляют 2 капли 1% раствора CH_3COOH (слабокислая среда). Нагревают, наблюдают сначала помутнение (белок теряет заряд и приближение к изоэлектрическому состоянию), а при дальнейшем нагревании – белый хлопьевидный осадок.

В 3-ю пробу добавляют 2 капли 10% раствора CH_3COOH (сильнокислая среда) и нагревают. Обычно осадок не образуется, так как частицы 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 + электролит) и нагревают. Осадок белка выпадает, так как происходит нейтрализация заряда на частицах белка.

В 5-ю пробу добавляют 2 капли 10% раствора NaOH (щелочная среда) и нагревают. Осадок не образуется, так как отрицательный заряд на частицах белка усиливается.

Оформление работы

Отмечают принцип метода, ход работы, регистрируют в таблице результаты и делают вывод о механизмах осаждения белка.

№ пробы	Реактивы	pH	Результаты	Вывод о механизме осаждения

ТЕМА 1.3. КЛАССИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ. СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИИ БЕЛКОВ В ОРГАНИЗМЕ. СЛОЖНЫЕ БЕЛКИ

АКТУАЛЬНОСТЬ

Пептиды и белки выполняют разнообразные специфические функции в организме: структурная, транспортная, гормональная, ферментативная и др.

Изменение в строении белков может лежать в основе развития патологических процессов (серповидно-клеточная анемия, талассемии). В то же время многие заболевания влекут за собой сдвиги содержания и соотношения белков, в частности в плазме крови, что позволяет использовать их для диагностики.

Реакции открытия белка и простетической группы позволяют понять состав и строение сложных белков, а также использовать эти данные для количественного определения белков.

ЦЕЛЬ

Изучить структуру сложных белков: фосфопротеинов, нуклеопротеинов, гликопротеинов, хромопротеинов (гемо- и флавопротеинов), металлопротеинов, липопротеинов.

Научиться выделять сложные белки из различных объектов и проводить качественные реакции на компоненты сложных белков.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Структурные формулы протеиногенных аминокислот.
2. Классификация белков по функциональным признакам (защитные, структурные, транспортные, сократительные, гормональные, ферментативные). Примеры белков каждого класса.
3. Классы белков в зависимости от их строения: простые и сложные, момеры и полимеры, глобулярные и фибриллярные. Примеры белков каждого класса.
4. Характеристика простых белков (альбумины, глобулины, гистоны, протамины). Отметьте особенности их строения и функции.
5. Характеристика и особенности строения классов сложных белков:
 - **Нуклеопротеины.** Общая структура и свойства ДНК и РНК. Каковы отличия ДНК и РНК? Строение нуклеотидов на примере АМФ, АДФ, АТФ, цАМФ. Типы гистонов, их роль в образовании нуклеосом и укладке ДНК.
 - **Хромопротеины** (гемопротеины, флавопротеины, ретинальпротеины). Понятие о химической структуре, их основные представители и функции. Представление о строении молекулы гемоглобина. Структура гема.
 - **Гликопротеины**, структура, функции в организме. Представление о строении углеводной части. Протеогликаны, структура, функции в организме. Химическая структура гиалуроновой кислоты и хондроитинсульфатов.
 - **Липопротеины.** Структура липопротеиновой частицы. Основные транспортные формы липидов плазмы – хиломикроны, липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП), липопротеины низкой плотности (ЛПНП), липопротеины высокой плотности (ЛПВП). Их функции.

- **Металлопротеины**, представление о строении. Основные представители. Что такое металлоферменты? Их примеры.
 - **Фосфопротеины**. Каким образом присоединяется фосфатная группа к белку? Основные представители.
6. Анализ химического состава сложных белков – гликопротеинов и фосфопротеинов. Принцип методов.
- ТЕМЫ ДЛЯ РЕФЕРАТИВНЫХ СООБЩЕНИЙ**
1. Структурные белки организма: кератин, коллаген, эластин. Особенности строения. Функции.
 2. Сократительные белки мышечной ткани: актин и миозин. Особенности строения. Функция.

Лабораторная работа 1

ВЫДЕЛЕНИЕ И АНАЛИЗ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ФОСФОПРОТЕИНОВ И ГЛИКОПРОТЕИНОВ

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

Реактивы

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

Анализ химического состава фосфопротеинов

Материал исследования

Молоко.

Проведение анализа

К 2,0 мл молока приливают равный объем дистиллированной воды, перемешивают. Добавляют 2 капли конц. CH₃COOH. При подкислении (рН 4,7) молоко свертывается, т.е. происходит выпадение в осадок белка казеиногена. Полученный хлопьевидный осадок отфильтровывают. Осадок на фильтре делят на две части: с одной частью проводят биуретовую реакцию, в другой определяют наличие фосфорной кислоты.

<p>Молибденовая проба на фосфорную кислоту</p>	<p><i>Принцип</i> Присутствующая в осадке фосфорная кислота, взаимодействуя с молибденово-кислым аммонием в азотной кислоте, образует окрашенное в лимонно-желтый цвет комплексное соединение аммония фосфомолибдата.</p> <p><i>Проведение реакции</i> Половину осадка снимают палочкой с фильтра в пробирку. Для выявления фосфора добавляют 20 капель молибденового реактива. Нагревают в кипящей водяной бане. После охлаждения пробирки в струе воды фосфомолибдат аммония выпадает в осадок.</p>
<p>Биуретовая реакция</p>	<p><i>Принцип</i> В щелочной среде образуется комплексное соединение с развитием розово-фиолетового или сине-фиолетового окрашивания.</p> <p><i>Проведение реакции</i> К оставшейся на фильтре части осадка добавляют 10 капель 10% р-ра NaOH и 1 каплю 1% р-ра CuSO₄.</p>
<p><i>Анализ химического состава гликопротеинов</i> <i>Материал исследования</i> Слюна, собранная после ополаскивания рта водой. <i>Проведение анализа</i> В 2 пробирки собирают по 1 мл слюны, по каплям приливают конц. уксусную кислоту до появления сгустка муцина.</p>	
<p>Реакция Молиша на углеводные группы</p>	<p><i>Принцип</i> После дегидратации пентоз серной кислотой образуется гидроксиметилфурфурол. При конденсации тимола с гидроксиметил-фурфуролом развивается красное окрашивание, которое проявляется в виде розового кольца в пробирке.</p> <p><i>Проведение реакции</i> Из 1-й пробирки жидкость сливают и к сгустку добавляют 2-3 капли р-ра тимола. Перемешивают и осторожно по стенке добавляют конц. H₂SO₄.</p>
<p>Биуретовая реакция</p>	<p><i>Принцип</i> В щелочной среде образуется комплексное соединение с развитием розово-фиолетового или сине-фиолетового окрашивания.</p> <p><i>Проведение реакции</i> В другую пробирку предварительно добавляют 10 капель 10% р-ра NaOH для нейтрализации кислоты. Затем добавляют еще 10 капель 10% р-ра NaOH и 1 каплю 1% р-ра CuSO₄.</p>

Оформление работы

Отмечается ход работы, результаты заносятся в таблицу. Делается вывод о наличии в составе сложных белков обнаруживаемого компонента.

Объект иссл-я	Сложные белки	Выявляе- мый ком- понент	Окрашива- ние	Вывод о присутст- вии
Слюна	Гликопротеи- ны	Белок Углеводы		
Молоко	Фосфопротеи- ны	Белок Фосфорная кислота		

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один правильный ответ.

1. НЕЗАМЕНИМОЙ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ЯВЛЯЕТСЯ АМИНОКИСЛОТА
 - 1) глицин
 - 2) валин
 - 3) тирозин
 - 4) серин
2. ПРИ PH 7,4 ПОЛОЖИТЕЛЬНО ЗАРЯЖЕНА АМИНОКИСЛОТА
 - 1) пролин
 - 2) оксипролин
 - 3) аргинин
 - 4) аспартат
3. ПРОСТЫМ БЕЛКОМ ЯВЛЯЕТСЯ
 - 1) гемоглобин
 - 2) соматотропин
 - 3) альбумин
 - 4) церулоплазмин
4. АЛЬФА-СПИРАЛИ СТАБИЛИЗИРУЮТСЯ В ПРОСТРАНСТВЕ
 - 1) дисульфидными мостиками
 - 2) гидрофобными взаимодействиями
 - 3) кооперативным эффектом
 - 4) пептидными связями
 - 5) водородными связями
5. ТРЕТИЧНАЯ СТРУКТУРА БЕЛКОВ СТАБИЛИЗИРУЕТСЯ В ПРОСТРАНСТВЕ
 - 1) электростатическими взаимодействиями радикалов аминокислот

- 2) водородными связями
 - 3) гидрофобными взаимодействиями
 - 4) дисульфидными мостами
 - 5) взаимодействием в простетических группах
 - 6) всеми указанными связями
6. 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
7. В ЭЛЕКТРИЧЕСКОМ ПОЛЕ ПРИ РН 6,8 ПЕПТИД АСП-ЛЕЙ-ГЛУ-ГЛИ БУДЕТ
- 1) двигаться к аноду
 - 2) оставаться на месте
 - 3) двигаться к катоду
8. ЦЕНТР СВЯЗЫВАНИЯ С ЛИГАНДОМ ФОРМИРУЕТСЯ НА УРОВНЕ
- 1) первичной структуры
 - 2) третичной структуры
 - 3) вторичной структуры
 - 4) четвертичной структуры
9. В АППАРАТЕ "ИСКУССТВЕННАЯ ПОЧКА" ИСПОЛЬЗОВАНО ТАКОЕ СВОЙСТВО БЕЛКОВ, КАК
- 1) неспособность проникать через полупроницаемые мембраны (диализ)
 - 2) способность связывать полярные молекулы
 - 3) создание онкотического давления
 - 4) низкая скорость диффузии
10. КООПЕРАТИВНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ НА УРОВНЕ
- 1) первичной структуры
 - 2) третичной структуры
 - 3) вторичной структуры
 - 4) четвертичной структуры

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

1. Как выяснить, произошло ли полное осаждение белка из биологической жидкости, в которой создано 50%-ное насыщение сульфатом аммония (после отделения осадка жидкость стала прозрачной)?

2. При частичном гидролизе инсулина (В-цепь) обнаружен тетрапептид Глу–Глу–Ала–Лей.

Укажите направление движения этого пептида в электрическом поле при рН 3,0 и 10,5.

3. В биохимической лаборатории исследуется электрофоретическая подвижность белков.

В каком направлении будут двигаться в электрическом поле к аноду, катоду или оставаться на старте следующие белки:

а) яичный альбумин при рН 5,0 (изоэлектрическая точка рН 4,6),

б) β -лактоглобулин при рН 5,0 и 7,0 (изоэлектрическая точка рН 5,2),

в) химотрипсиноген при рН 5,0; 9,5 и 11,0 (изоэлектрическая точка рН 9,5)?

4. При частичном гидролизе белка и последующем фракционировании получены два пептида:

а) Гли–Ала–Вал–Лей–Иле;

б) Тре–Асп–Лиз–Тир–Глу.

Какое из этих соединений более похоже по свойствам на углеводород?

Какое из них можно отнести к более растворимым в неводной жироподобной среде?

Как каждое из этих соединений ведет себя при биуретовой пробе, нингидриновой реакции, реакции Милона, реакции Фоля и ксантопротеиновой реакции?

Какое из них могло бы быть более способным к участию в образовании солевых мостиков?

Все ответы подробно объяснить.

РАЗДЕЛ 2

СТРОЕНИЕ, КЛАССИФИКАЦИЯ И РОЛЬ ВИТАМИНОВ

ТЕМА 2.1. ЖИРОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ

АКТУАЛЬНОСТЬ

Жирорастворимые витамины – гидрофобные органические вещества. В организме они не синтезируются и являются незаменимыми пищевыми факторами. Исключением является витамин D, синтезируемый в коже, но в недостаточном количестве. При недостаточном поступлении витаминов в организм развиваются тяжелые состояния (гипо- и авитаминозы), приводящие к нарушениям метаболизма. Биологическая роль жирорастворимых витаминов связана с регуляцией обменных процессов в организме, так как эти витамины влияют на синтез структурных белков и ферментов, что особенно актуально в детском возрасте.

Теоретические сведения о витаминах, а также практические навыки качественного и количественного определения этих веществ в различных биологических объектах нужны врачу для профилактики гипо- и авитаминозов, для использования витаминов в качестве неспецифического средства при лечении заболеваний кожи, печени, мышечной и костной системы и т.п.

ЦЕЛЬ

Изучить свойства, химическую структуру, классификацию, биологическую роль жирорастворимых витаминов, клиническую картину авитаминозов.

Научиться проводить качественные реакции со стандартными растворами жирорастворимых витаминов.

Использовать полученные навыки для обнаружения жирорастворимых витаминов в биологических объектах.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Дайте общую характеристику витаминов, опишите их роль. Классификация и номенклатура витаминов.
2. Характеристика гипо- и авитаминозов, гипервитаминозов, их экзогенные и эндогенные причины. Причины гиповитаминозов у детей.
3. Провитамины – β -каротин, эргостерол, 7-дегидрохолестерол. Превращение провитаминов в витамины на примере β -каротина. Понятие о каротиноидах и их роли в организме.
4. Понятие об антивитаминах. Использование антивитаминов в качестве лекарственных средств. Механизм действия и область применения дикумарола как антивитамина К.

5. Характеристика отдельных жирорастворимых витаминов по плану:
- строение витаминов А, Е, К, D₂ и D₃, F;
 - строение активных форм витаминов А и D;
 - пищевые источники;
 - минимальная суточная потребность;
 - биохимические функции, примеры реакций и/или процессов, в которых принимает участие витамин;
 - картина гипо- и авитаминоза, гипервитаминоза.
6. Биохимические проявления недостаточности витамина D, витамин D-зависимого и витамин D-резистентного рахита. Роль заболеваний печени и почек в развитии картины гиповитаминоза D.
7. Качественные реакции на ретинол, токоферол, викасол, кальциферол. Принцип методов.
8. Качественные реакции обнаружения витаминов А, Е и D в биологическом материале.
9. Составьте таблицу по жирорастворимым витаминам

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

ТЕМЫ ДЛЯ РЕФЕРАТИВНЫХ СООБЩЕНИЙ

1. История открытия витаминов. Работы отечественных и зарубежных ученых.
2. Рахит – виды, биохимические причины, профилактика, лечение. Рахитоподобные состояния.
3. Витамин А, его активные формы ретиналь и ретиноевая кислота. Участие в обмене веществ и фотохимическом акте зрения.
4. Витамин D, его активные формы. Участие в обмене веществ.

Лабораторная работа 1

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ЖИРОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ

КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА РЕТИНОЛ

Принцип

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

Реактивы

1) Конц. H_2SO_4 , 2) бутанол.

Материал исследования

Витамин А, 3,44% масляный раствор.

Проведение анализа

В пробирку вносят 2 капли раствора витамина А и 5 капель бутанола. Оставляют на 1 минуту, периодически встряхивая. Затем добавляют 1-2 капли конц. H_2SO_4 . Появляется синее окрашивание, переходящее в фиолетовое, затем в красно-бурое.

КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ХОЛЕКАЛЬЦИФЕРОЛ

Принцип

При взаимодействии витамина D_3 с оксиметилфурфуролом, образующимся из сахарозы под действием концентрированной серной кислоты, появляется красно-фиолетовое окрашивание.

Реактивы

1) Конц. H_2SO_4 , 2) бутанол, 3) 20% р-р сахарозы.

Материал исследования

Витамин D_3 , масляный раствор, 15 тыс МЕ/мл.

Проведение анализа

В пробирку вносят 3 капли раствора витамина D_3 и 5 капель бутанола, добавляют 3 капли раствора сахарозы и 3 капли конц. H_2SO_4 . Появляется красно-фиолетовое окрашивание, переходящее в черно-бурое.

КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ТОКОФЕРОЛ

Принцип

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

Реактивы

Конц. HNO_3 .

Материал исследования

Витамин Е, 30,0 % масляный раствор.

Проведение анализа

В сухую пробирку вносят 2 капли раствора витамина Е и добавляют 10 капель конц. HNO_3 . Пробирку встряхивают и наблюдают появление красного окрашивания. Для ускорения реакции

пробирку можно поместить на 3 минуты в кипящую водяную баню.

КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ВИТАМИН К

Принцип

Викасол (синтетический аналог витамина К₁) в присутствии цистеина в щелочной среде окрашивается в лимонно-желтый цвет.

Реактивы

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

Материал исследования

0,05% р-р викасола.

Проведение анализа

К 5 каплям раствора викасола добавляют 5 капель раствора цистеина и 1 каплю 10% раствора NaOH. Развивается лимонно-желтое окрашивание.

Клинико-диагностическое значение

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

Оформление работы

Отмечают принцип методов, ход работы, регистрируют результаты анализа в таблице и делают вывод о возможности обнаружения витаминов данным методом.

Исследуемые витамины	Используемый метод и реактивы	Результат

Лабораторная работа 2

ОЦЕНКА ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ НА НАЛИЧИЕ В НИХ ЖИРОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ

Материал исследования

Плоды шиповника, дрожжи, растительное масло, молоко, рыбий жир.

Проведение анализа

Плоды шиповника предварительно измельчают. К измельченному шиповнику и дрожжам добавляют по 1 мл бутанола, экстрагируют в течение 5 минут. В дальнейшей работе используют экстракт.

В работе используются методы и количественное соотношение реагентов точно так, как в работе "Качественные реакции на жирорастворимые витамины".

Оформление работы

Регистрируют результаты анализов в таблице. Сравнивают результаты с табличными данными. Делают вывод о пищевых источниках витаминов А, Е и D.

Исследуемые витамины	Материал исследования	Результат (окрашивание)	Вывод о наличии витамина в продукте
Витамин А	Рыбий жир Растительное масло Молоко Плоды шиповника		
Витамин Е	Рыбий жир Растительное масло Молоко Плоды шиповника		
Витамин D	Рыбий жир Растительное масло Молоко Сухие дрожжи		

ТЕМА 2.2. ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ

АКТУАЛЬНОСТЬ

Водорастворимые витамины – низкомолекулярные органические вещества различной химической природы, регуляторы обменных процессов и жизнедеятельности организма. В организме они не синтезируются и являются незаменимыми пищевыми факторами. Исключением является витамин РР, синтезируемый в печени в недостаточном количестве. При недостаточном поступлении витаминов развиваются тяжелые состояния – гипо- и авитаминозы. Биологическая роль водорастворимых витаминов связана с регуляцией обменных процессов в организме, поскольку многие из них входят в состав коферментов (простетических групп) ферментов.

Теоретические сведения о витаминах, а также практические навыки качественного и количественного определения этих веществ в различных биологических объектах нужны врачу для профилактики гипо- и авитаминозов, для использования витаминов в качестве неспецифического средства лечения ряда заболеваний кожи, печени, крови и т.п.

ЦЕЛЬ

Изучить свойства, химическую структуру, классификацию, биологическую роль витаминов, клиническую картину авитаминозов.

Приобретение практических навыков по проведению качественных реакций на витамины. Использовать полученные навыки для обнаружения водорастворимых витаминов в биологических объектах.

Научиться количественному определению витамина С в различных растительных объектах и моче.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Характеристика всех водорастворимых витаминов по плану:
 - строение – химическая формула витаминов В1 (тиамин), В2 (рибофлавин), В3 (РР, никотиновая кислота, никотинамид), В5 (пантотеновая кислота), В6 (пиридоксин), С (аскорбиновая кислота), Н (биотин). Представление о строении витаминов В9 (фолиевая кислота), В12 (цианкобаламин);
 - пищевые источники;
 - минимальная суточная потребность;
 - формула кофермента (ТДФ, ФМН и ФАД, НАД+ и НАДФ+, ПФ);
 - биохимические функции, примеры реакций и/или процессов, в которых принимает участие кофермент;
 - возможные причины гипо- и авитаминоза и его клинические проявления.
2. Механизм антибактериальной активности сульфаниламидных препаратов.
3. Антивитамины – изониазид, авидин, птеридины. Механизм их действия. Использование антивитаминов в качестве лекарственных средств
4. Качественные реакции на тиамин, рибофлавин, никотиновую кислоту, пиридоксин, цианкобаламин, аскорбиновую кислоту. Принцип методов.
5. Количественное определение аскорбиновой кислоты в растительных объектах. Принцип метода. Нормальное содержание витамина С в продуктах питания.
6. Количественное определение аскорбиновой кислоты в моче. Принцип метода. Нормальные величины. Клинико-диагностическое значение определения витамина в моче.

ТЕМЫ ДЛЯ РЕФЕРАТИВНЫХ СООБЩЕНИЙ

1. Витаминоподобные соединения, общая характеристика, виды, роль в метаболизме.
2. Витамин Р (биофлавоноиды), его значение и потребность для детского организма.

3. Моно- и поливитаминные препараты для неспецифической терапии. Достоинства и недостатки употребления этих препаратов в повседневной жизни.
4. Наследственные нарушения обмена и функций витамина В₁₂.

Лабораторная работа 1

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ

Реактивы

1) 10% р-р NaOH, 2) конц. HCl, 3) 1% р-р FeCl₃, 4) 10 % р-р тиомочевины, 5) 10% р-р CH₃COOH, 6) 5% р-р Cu(CH₃COO)₂, 7) изобутиловый спирт, 8) цинк металлический. 9) 5% р-р калия гексацианоферрата K₃Fe(CN)₆ (красная кровяная соль), 10) порошок гидросульфита натрия, 11) 0,001М р-р 2,6-дихлорфенол-индофенола (краска Тильманса), 12) 10% р-р HCl, 13) 10% р-р Na₂CO₃, 14) 0,01% р-р метиленового синего, 15) 2% р-р HCl.

Оборудование

Ртутно-кварцевая лампа, водяная баня.

Исследуемый материал

6% р-р тиамин бромид, 5% р-р пиридоксин гидрохлорид, сухая никотиновая кислота, 0,025% р-р рибофлавин, 1,0% раствор витамина В₁₂, 1% раствор аскорбиновой кислоты.

КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ТИАМИН

Принцип

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

Исследуемый материал

5% р-р тиамин бромид.

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 и наблюдают флуоресценцию в лучах ртутно-кварцевой лампы.

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА РИБОФЛАВИН

Материал исследования

0,025% р-р рибофлавин. Перед употреблением разводят в 5 раз.

Реакция флуоресценции

Рибофлавин обладает окислительно-восстановительными свойствами. Это связано с наличием двойных связей в структуре изоаллоксазинового кольца, по месту разрыва которых могут присоединяться к азоту 2 протона и 2 электрона окисляемого субстрата.

Принцип

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

Проведение анализа

В пробирку вносят 10 капель раствора рибофлавина и приливают в каждую по 5 мл дистиллированной воды. Отмечают наличие флуоресценции.

Добавляют на кончике скальпеля порошок натрия гидросульфита (восстановитель) и наблюдают за гашением флуоресценции.

Реакция восстановления

Принцип

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

Проведение анализа

К 10 каплям раствора рибофлавина добавляют 5 капель концентрированной HCl и гранулу металлического цинка. Жидкость окрашивается в розовый цвет, а затем обесцвечивается.

КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА НИКОТИНОВУЮ КИСЛОТУ

Принцип

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

Материал исследования

Порошок никотинамида.

Проведение анализа

5-10 мг (щепотка) никотиновой кислоты помещают в пробирку с 10 каплями 10% раствора CH_3COOH и растворяют при нагревании. К нагретому до кипения раствору добавляют равный объем раствора уксусно-кислой меди. Жидкость становится мутной.

При стоянии и постепенном охлаждении раствора выпадает синий осадок медной соли никотиновой кислоты.

КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ПИРИДОКСИН

Принцип

Витамин B_6 с FeCl_3 образует комплексную соль красного цвета.

Материал исследования

1% р-р витамина B_6 .

Проведение анализа

К 5 каплям 1% раствора витамина B_6 прибавляют равное количество 1% раствора FeCl_3 . Развивается красное окрашивание.

КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ЦИАНКОБАЛАМИН

Принцип

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

Материал исследования

1% р-р витамина В₁₂.

Проведение анализа

1. Подготовительный этап (выполняет лаборант)

В пробирку вносят 5 капель раствора витамина В₁₂, 5 капель концентрированной серной кислоты и сжигают (минерализуют) при нагревании под тягой. Затем пробирку охлаждают под током воды и добавляют 1 мл воды. Готовый минерализат используется в цветной реакции.

2. Цветная реакция

На беззольный фильтр наносят 2-3 капли тиомочевины, высушивают в горячем воздухе над плиткой. На фильтр наносят 1-2 капли минерализата витамина В₁₂ и вновь высушивают в горячем воздухе.

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

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА АСКОРБИНОВУЮ КИСЛОТУ

Материал исследования

1% р-р аскорбиновой кислоты.

Реакция с метиленовым синим

Принцип

Аскорбиновая кислота обладает способностью восстанавливать метиленовый синий, окисляясь при этом до дегидроаскорбиновой кислоты. Метиленовый синий при восстановлении обесцвечивается.

Проведение анализа

В 1-ю пробирку вносят 5 капель 1% раствора аскорбиновой кислоты, во 2-ю – 5 капель дистиллированной воды. В обе пробирки вносят по капле 0,01% раствора метиленового синего и ставят в водяную баню при +40°C. Наблюдают обесцвечивание жидкости в пробирке с витамином.

Реакция с раствором калия гексацианоферрата

Принцип

Аскорбиновая кислота способна восстанавливать калия гексацианоферрат $K_3Fe(CN)_6$, окисляясь до дегидроаскорбиновой кислоты. При этом $K_3Fe(CN)_6$ восстанавливается до $K_4Fe(CN)_6$, который с ионами трехвалентного железа дает соль $Fe_4[Fe(CN)_6]$ сине-зеленого цвета.

Проведение анализа

К 10 каплям 1% раствора аскорбиновой кислоты прибавляют 10 капель 5% раствора калия гексацианоферрата $K_3Fe(CN)_6$ и 5

капель 1% раствора FeCl₃. Наблюдают образование синезеленого окрашивания (берлинская лазурь).

Оформление работы

Отмечают принцип методов, ход работы, регистрируют результаты анализа в таблице и делают вывод о возможности обнаружения витаминов данным методом.

Исследуемые витамины	Используемый метод и реактивы	Результат

Лабораторная работа 2

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Принцип

Аскорбиновая кислота, содержащаяся в биологическом материале, восстанавливает в 2,6-дихлорфенолиндофеноле кетогруппу до спиртовой группы с образованием окрашенной лейкоформы 2,6-дихлорфенолиндофенола. При полном окислении аскорбиновой кислоты в кислой среде титруемый раствор приобретает розовую окраску. По количеству красителя, затраченному на титрование, определяют количество витамина.

Количественное определение содержания аскорбиновой кислоты в моче

Материал исследования

Моча.

Проведение анализа

В колбу отмеряют 5 мл мочи и 5 мл дистиллированной воды, перемешивают, прибавляют 2,5 мл 2% раствора HCl. Титруют краской Тильманса до розовой окраски, сохраняющейся в течение 30 секунд. Записывают объем.

Рассчитывают содержание аскорбиновой кислоты в суточном объеме мочи по формуле:

$$\text{Содержание аскорбиновой кислоты, мг/сут} = \frac{0,088 \times A \times B}{B}, \text{ где}$$

0,088 – количество витамина С (мг), соответствующее 1 мл 0,001 М раствора краски Тильманса; А – количество краски, затраченной на титрование (мл); В – средний суточный объем мочи (1000-1500 мл); В – объем мочи, взятый для титрования (мл).

Нормальные величины

Моча 20-30 мг/сут

Клинико-диагностическое значение

Метод используется для диагностики недостаточности аскорбиновой кислоты в организме. Концентрация витамина в моче

понижается в 4-5 раз при гиповитаминозе С, токсикозах, бронхопневмониях, острых и хронических инфекционных заболеваниях. Повышение концентрации витамина в моче может быть при избыточном приеме аскорбиновой кислоты или поливитаминных препаратов.

Оформление работы

Отмечают принцип метода, ход работы, регистрируют результаты анализа. Оценивают обеспеченность организма витамином С. Необходимо указать биохимические процессы, требующие наличия аскорбиновой кислоты, и возможные нарушения состояния организма при гиповитаминозе.

Количественное определение содержания аскорбиновой кислоты в растительном материале

Материал исследования

Картофель, плоды шиповника.

Проведение анализа

1. Приготовление экстракта витамина С.

Навеску исследуемого материала (5 г картофеля или 1 г плодов шиповника) помещают в ступку, измельчают при необходимости ножницами и скальпелем, затем растирают с 5 мл 2% р-ра соляной кислоты, постепенно вливая 20 мл дистиллированной воды. Оставляют на 5 минут.

2. Для исследования берут часть экстракта (V_2), который переносят в колбу для титрования. Для экстракта картофеля объем V_2 равен 10 мл. Экстракт плодов шиповника берут в объеме 1 мл и разводят с дистиллированной водой в соотношении 1:5,

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

4. Рассчитывают содержание аскорбиновой кислоты (мг в 100 г продукта) по формуле:

$$\text{Содержание аскорбиновой кислоты, мг} = \frac{0,088 \times A \times V_1 \times 100 \times B}{V_2 \times 5}, \text{ где}$$

0,088 – количество витамина С (мг), соответствующее 1 мл 0,001 М раствора краски Тильманса; А – количество краски, затраченной на титрование (мл); Б – количество продукта, взятого для анализа (г);

V_1 – общее количество экстракта (мл); V_2 – объем экстракта, взятый для титрования (мл); 100 – пересчет на 100 г продукта, 5 – разведение экстракта шиповника (в 5 раз)

Нормальные величины

Картофель	20 мг/100 г
Плоды шиповника	1500 мг/100 г

Оформление работы

Отмечают принцип метода, ход работы, регистрируют результаты анализа. В выводе сравнивают полученные значения с табличными, рассчитывают количество продукта, необходимое для удовлетворения суточной потребности в витамине. Также в выводах указывают лучшие пищевые источники аскорбиновой кислоты.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один правильный ответ.

1. ОСНОВНАЯ ФУНКЦИЯ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ – ЭТО
 - 1) предшественники гормонов
 - 2) защита биологических мембран
 - 3) предшественники коферментов
 - 4) предшественники углеводов
2. КОФЕРМЕНТНАЯ ФОРМА ВИТАМИНА В₁ НАЗЫВАЕТСЯ
 - 1) пиридоксальфосфат
 - 2) флавинмононуклеотид
 - 3) тиаминдифосфат
 - 4) никотинамидадениндинуклеотид
3. КОФЕРМЕНТНАЯ ФОРМА ВИТАМИНА В₂ НАЗЫВАЕТСЯ
 - 1) пиридоксальфосфат
 - 2) флавинадениндинуклеотид
 - 3) тетрагидрофолат
 - 4) коэнзим А
4. ПАНТОТЕНОВАЯ КИСЛОТА ЯВЛЯЕТСЯ СОСТАВНОЙ ЧАСТЬЮ КОФЕРМЕНТА
 - 1) коэнзим-А
 - 2) тетрагидрофолиевая кислота
 - 3) тиаминпирофосфат
 - 4) флавинмононуклеотид
5. ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ПРИЕМЕ АНТИБИОТИКОВ И СУЛЬФАНИЛАМИДОВ У ЧЕЛОВЕКА РАЗВИВАЕТСЯ ГИПОВИТАМИНОЗ В₆. ЭТО ОБУСЛОВЛЕНО
 - 1) подавлением микрофлоры кишечника
 - 2) связыванием лекарства с витамином
 - 3) действием лекарства на синтез коферментной формы
 - 4) ингибированием пиридоксин-зависимых ферментов
6. ПРИ ДЕФИЦИТЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ РАЗВИВАЕТСЯ ЦИНГА, Т.К.
 - 1) окисляются сульфгидрильные группы ферментов

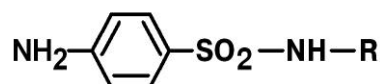
- 2) нарушается синтез коллагена
 - 3) нарушается синтез альбумина
 - 4) окисляются липидные мембраны клеток соединительной ткани
7. ПРОСТЕТИЧЕСКОЙ ГРУППОЙ РОДОПСИНА РЕЦЕПТОРНОГО БЕЛКА СЕТЧАТКИ ГЛАЗА ЯВЛЯЕТСЯ –
- 1) рибофлавин
 - 2) кальциферол
 - 3) ретиналь
 - 4) токоферол
8. В СОСТАВ ВИТАМИНА F ВХОДЯТ
- 1) олеиновая, линолевая и линоленовая кислоты
 - 2) олеиновая, линолевая и стеариновая кислоты
 - 3) арахидоновая, линолевая и линоленовая кислоты
 - 4) олеиновая, линолевая и арахидоновая кислоты
9. ДЛЯ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ВИТАМИНА А ХАРАКТЕРНЫ
- 1) гиперкератоз
 - 2) снижение концентрации родопсина в крови
 - 3) кровоточивость
 - 4) остеомалация
10. 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 свертывания крови

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

1. Бактерии *Lactobacillus casei* способны расти на простой культуральной среде, содержащей витамины рибофлавин и пиридоксин и 4 аминокислоты. Если в культуральную среду добавить полный набор аминокислот и рибофлавин, то количество пиридоксина, необходимого для оптимального роста бактерий, сократится на 90%.

Объясните, почему это происходит.

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



Строение сульфаниламидов

На чем основано использование сульфаниламидов? Что также нужно рекомендовать при применении этих препаратов?

3. Больному предстоит операция.

Какие витамины следует назначить до операции? Почему?

РАЗДЕЛ 3. ЭНЗИМОЛОГИЯ

ТЕМА 3.1. СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ В МЕДИЦИНЕ

АКТУАЛЬНОСТЬ

Ферменты – белковые молекулы, выполняющие в живой клетке функции биокатализаторов. Изучение строения и функционирования ферментов необходимо для понимания обмена веществ и его регуляции, а также патогенеза заболеваний, связанных с нарушением работы ферментов.

ЦЕЛЬ

Знакомство со строением и свойствами ферментов, особенностями ферментативного катализа.

Изучение влияния некоторых факторов на активность ферментов *in vitro*.

Приобретение практических навыков по исследованию специфичности ферментов, по изучению влияния на активность ферментов температуры, активаторов и инактиваторов.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Строение простых и сложных белков.
2. Коферментные формы витаминов В₁ (ТДФ), В₂ (ФМН и ФАД), РР (НАД⁺ и НАДФ⁺), В₆ (ПФ).
3. Биологическая роль ферментов. Понятие энергетического барьера реакции и энергии активации.
4. Этапы ферментативного катализа.
5. Характеристика структурно-функциональной организации ферментов по плану:
 - простые ферменты;
 - сложные ферменты: понятие холофермента, апофермента, кофактора, кофермента, простетической группы;
 - активный центр (контактный и каталитический участки);
 - аллостерический центр.
6. Кислотно-основной и ковалентный механизмы катализа.
7. Сходство и различие в действии ферментов и неорганических катализаторов.
8. Общие принципы количественного определения активности ферментов. Единицы активности ферментов.
9. Мультиферментный комплекс, строение, принципы самосборки, роль. Примеры.
10. Изоферменты, особенности их строения на примере лактатдегидрогеназы и креатинкиназы.

11. Основные свойства ферментов. Графики зависимости скорости ферментативной реакции:
 - от температуры;
 - от pH среды;
 - от концентрации субстрата;
 - от концентрации фермента.
12. Специфичность, виды специфичности. Механизмы специфичности – теория Фишера и теория Кошланда.
13. Практическое использование ферментов в медицине: энзимодиагностика и энзимотерапия. Примеры.
14. Энзимопатии, первичные и вторичные формы. Примеры. Роль отсутствия коферментов в развитии энзимопатий.
15. Исследование восстановления пероксида водорода ферментом каталазой. Принцип метода.
16. Исследование специфичности действия ферментов на примере амилазы и уреазы. Принцип метода.
17. Влияние активаторов и инактиваторов ферментов на скорость реакции на примере амилазы. Принцип метода.
18. Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры на примере амилазы слюны и дегидрогеназ дрожжей. Принцип методов.

ТЕМЫ ДЛЯ РЕФЕРАТИВНЫХ СООБЩЕНИЙ

1. Роль эссенциальных микроэлементов в функционировании и регуляции активности ферментов.

Лабораторная работа 1

ОЦЕНКА СКОРОСТИ РЕАКЦИИ СПОНТАННОГО И ФЕРМЕНТАТИВНОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА

Реактивы

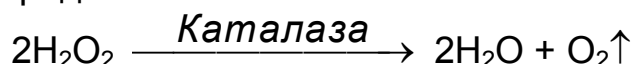
3% р-р H₂O₂.

Материал исследования

Свежая кровь животных – источник фермента каталазы.

Принцип

Каталаза (КФ 1.11.1.6.) ускоряет реакцию восстановления пероксида водорода:



В этой реакции одна молекула пероксида водорода окисляется и служит донором электронов, а другая восстанавливается и является акцептором электронов. Образующийся кислород выделяется в виде пузырьков.

Проведение анализа

В 2 пробирки вносят по 10 капель пероксида водорода. В одну из пробирок добавляют 1 каплю крови. Активность фермента выявляется по появлению пузырьков кислорода.

Оформление работы

Отмечают принцип метода, ход работы, сравнивают полученные результаты и объясняют их.

Лабораторная работа 2

ЗАВИСИМОСТЬ СКОРОСТИ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ

Исследование влияния температуры на активность амилазы слюны

Реактивы

1) 1% р-р крахмала, 2) р-р Люголя.

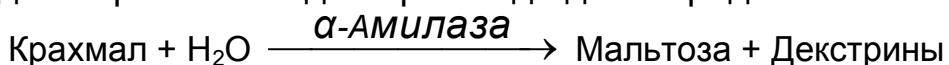
Материал исследования

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

Принцип

Для исследования зависимости скорости ферментативной реакции от температуры в работе используется гидролиз крахмала амилазой (диастаза, 1,4- α -D-глюкангидролаза, КФ 3.2.1.1.) слюны. При инкубации смеси субстрата (крахмал) и фермента (амилаза слюны) в разных температурных условиях фермент будет гидролизовать неодинаковое количество субстрата.

Гидролиз крахмала под действием амилазы проходит через стадии образования декстринов до дисахарида мальтозы.



Количество расщепленного крахмала оценивают по цветной реакции с йодом. Нерасщепленный крахмал с йодом дает синее окрашивание. Продукты гидролиза крахмала (декстрины) в зависимости от размера молекул дают с йодом окрашивание: ● амилодекстрины – фиолетовое, ● эритродекстрины – красное, ● ахродекстрины и мальтоза – цветная реакция отсутствует, желтый цвет соответствует цвету водного раствора йода.

Проведение реакции.

Приготовление препарата слюны (выполняет дежурный для всей группы).

Собирают 1 мл слюны в мерную пробирку и доводят дистиллированной водой до метки 10 мл, хорошо перемешивают (не встряхивая!).

1. В 4 пробирки (1, 2, 3, 4) вносят по 10 капель крахмала. Флакон с раствором крахмала предварительно взболтать! В следующие 4 пробирки (5, 6, 7, 8) вносят по 10 капель разведенной

слюны (раствор α -амилазы). Пробирки делят по парам – 1-5, 2-6, 3-7, 4-8.

Чтобы исключить ферментативную реакцию до достижения необходимой температуры, растворы слюны и крахмала сначала прогревают по отдельности.

2. 1-ю пару пробирок помещают в баню со льдом (0°C). 2-ю пару оставляют при комнатной температуре (20°C). 3-ю пару выдерживают при температуре 38-40°C. 4-ю пару пробирок помещают в кипящую водяную баню (100°C).

3. Через 3 минуты содержимое каждой пары пробирок объединяют, перемешивают и немедленно помещают на 10 минут в те же условия.

4. Проверяют ход реакции. Для этого из 3-й пробирки (38-40°C) отбирают на предметное стекло 3 капли смеси и добавляют 1 каплю реактива Люголя:

- если окраска синяя, то это указывает на низкую скорость гидролиза крахмала. В этом случае необходимо продлить время инкубации.
- появление красного или желтого окрашивания указывает на завершение гидролиза крахмала амилазой (можно переходить к п.5).

5. По завершении гидролиза крахмала в 3-й пробе во все пробирки одновременно добавляют по 2 капли реактива Люголя и сравнивают цвет раствора в пробах.

Оформление работы

Отмечают принцип метода, ход работы. Результаты работы оформляют в виде таблицы. В выводах отмечают оптимальную температуру действия фермента.

№ пробы	Температура инкубации	Окраска	Относительная скорость реакции
1	0°C		
2	20°C		
3	38°C		
4	100°C		

Исследование влияния температуры на активность дегидрогеназ дрожжей

Реактивы

1) 10% р-р глюкозы, 2) 0,01% р-р метиленового синего.

Материал исследования

Суспензия пекарских дрожжей.

Принцип

При окислении глюкозы анаэробные дегидрогеназы дрожжей катализируют реакции переноса атомов водорода от продуктов

окисления на промежуточный акцептор (восстановление акцептора). Обнаружение активности дегидрогеназ проводится по изменению окраски добавленного к суспензии дрожжей метиленового синего (акцептора), который при восстановлении обесцвечивается.

Проведение анализа

	Опыт 1, капли	Опыт 2, капли
Суспензия дрожжей	10	10
	Выдерживают при 100°C в течение 10 минут	—
10% р-р глюкозы	10	10
0,01% р-р метиленового синего	1	1
	Пробирки закрывают пробками и помещают на 10 минут в водяную баню при 38°C. Наблюдают за изменением окраски в пробирках.	

Оформление работы

Отмечают принцип метода и ход работы. Результаты работы оформляют в виде таблицы. В выводах отмечают причину изменения скорости реакции.

Пробы	Окраска	Относительная скорость реакции
Опыт 1		
Опыт 2		

Лабораторная работа 3

**ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ ДЕЙСТВИЯ
ФЕРМЕНТОВ**

Реактивы

1) 1% р-р мочевины, 2) 1% р-р тиомочевины, 3) 0,5% спиртовой р-р фенолфталеина, 4) 1% р-р крахмала, 5) 1% р-р сахарозы, 6) реактивы Фелинга: Фелинг I и Фелинг II.

Материал исследования

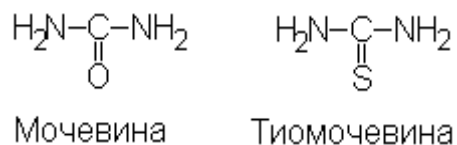
Приготовленный из семечек арбуза препарат уреазы.

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

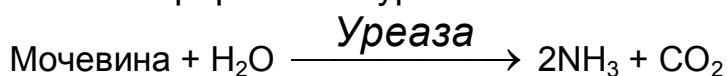
Обнаружение абсолютной специфичности действия фермента уреазы

Принцип

Метод основан на сравнении возможности гидролиза уреазой (КФ 3.5.1.5.), сходных по строению субстратов – мочевины и тиомочевины.



Действие фермента обнаруживается по изменению окраски индикатора фенолфталеина в щелочной среде, которая создается при выделении аммиака при гидролизе мочевины ферментом уреазой.



Проведение реакции

Приготовление препарата уреазы:

Очистить 3-4 семечка арбуза, зерна растереть в ступке в 1 мл дистиллированной воды, затем довести объем до 10 мл. Полученную эмульсию фильтруют и используют как препарат фермента уреазы.

	Опыт 1, капли	Опыт 2, капли
1% р-р мочевины	10	—
1 % р-р тиомочевины	—	10
Препарат уреазы	10	10
Р-р фенолфталеина	1-2	1-2
Перемешивают. Выдерживают 3-5 минут. Наблюдают за появлением розовой окраски в одной из пробирок.		

Оформление работы

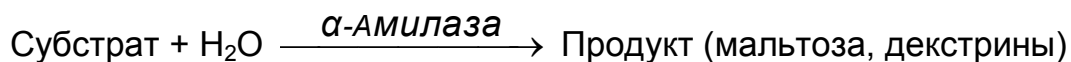
Отмечают принцип метода и ход работы. Результаты работы оформляют в виде таблицы. В выводах отмечают причину отсутствия окраски в одной из проб и специфичность фермента.

Пробы	Субстрат реакции	Окраска	Наличие реакции
Опыт 1			
Опыт 2			

Обнаружение специфичности действия амилазы слюны

Принцип

Метод основан на сравнительном изучении способности фермента амилазы (КФ 3.2.1.1.) гидролизовать разные углеводные субстраты – полисахарид крахмал и дисахарид сахарозу.



Действие фермента на субстрат выявляют при помощи качественной реакции на свободную альдегидную группу углеводов (реакция Троммера).

Реакция Троммера может быть положительной (красно-оранжевая окраска) только в случае расщепления субстратов до восстанавливающих сахаров (мальтоза, глюкоза и другие), которые имеют свободную альдегидную группу и обладают восстанавливающими свойствами. Субстраты реакции (крахмал и сахароза) не имеют свободной альдегидной группы, поэтому не дают положительной реакции Троммера.

Проведение реакции

Приготовление раствора слюны (выполняет дежурный для всей группы).

Собирают 1 мл слюны в мерную пробирку и доводят дистиллированной водой до метки 10 мл, хорошо перемешивают.

	Опыт 1, капли	Опыт 2, капли
1% р-р крахмала	—	10
1 % р-р сахарозы	10	—
Р-р слюны	5	5
Перемешивают. Инкубируют при температуре 37°C в течение 10 минут		
Реактив Феллинга I	3	3
Реактив Феллинга II	3	3
Перемешивают. Выдерживают в кипящей водяной бане при температуре 100°C до появления желтого или красно-оранжевого окрашивания в одной из пробирок		

Оформление работы

Отмечают принцип метода и ход работы. Результаты работы оформляют в виде таблицы. В выводах отмечают причину отсутствия реакции в одной из проб и специфичность фермента.

Пробы	Субстрат реакции	Окраска	Наличие реакции
Опыт 1			
Опыт 2			

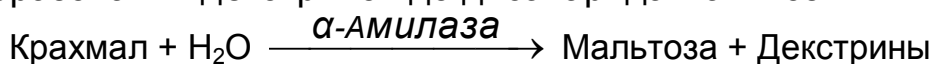
Лабораторная работа 4

ВЛИЯНИЕ АКТИВАТОРОВ И ИНАКТИВАТОРОВ НА АКТИВНОСТЬ АМИЛАЗЫ

Принцип

Метод основан на сравнении скорости гидролиза крахмала под действием амилазы (диастаза, 1,4- α -D-глюкангидролаза, КФ 3.2.1.1.) слюны без добавления каких-либо веществ и после добавления ионов Cl^- и Cu^{2+} . Активность фермента выявляется по степени гидролиза крахмала при помощи цветной реакции с йодом.

Нерасщепленный крахмал с йодом дает синее окрашивание. Гидролиз крахмала под действием амилазы проходит через стадии образования декстринов до дисахарида мальтозы.



Декстрины в зависимости от размера молекул дают с йодом окрашивание: ● амилодекстрины – фиолетовое, ● эритродекстрины – красно-бурое, ● ахродекстрины и мальтоза – цветная реакция отсутствует, желтый цвет соответствует цвету водного раствора йода.

Реактивы

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

Материал исследования

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

Проведение реакции

Приготовление препарата слюны (выполняет дежурный для всей группы).

Собирают 1 мл слюны в мерную пробирку и доводят дистиллированной водой до метки 10 мл, хорошо перемешивают.

Чтобы исключить протекание ферментативной реакции без влияющих факторов, их необходимо вносить в пробирки в первую очередь.

	Опыт 1, капли	Опыт 2, капли	Контроль, капли
Дистиллир. вода	—	—	10
0,9% раствор NaCl	10	—	—
1% раствор CuSO_4	—	10	—
Препарат слюны	10	10	10
1% раствор крахмала	10	10	10
	Перемешивают. Инкубируют при температуре 37°C в течение 10 мин		

Проверка хода гидролиза крахмала:

По истечении рекомендуемого времени инкубации готовят 3 дополнительные пробирки с водой по 1 мл в каждой, добавляют 1-2 капли реактива Люголя и прибавляют по 5 капель содержимого опытных пробирок. Сравнивают окраску раствора в дополнительных пробирках:

- если существенной разницы в окраске нет, то инкубацию опытных проб продлевают на 5-15 минут, после этого вновь проверяют ход гидролиза крахмала,
- если имеются видимые отличия в окраске, то работа закончена.

После окончания работы сравнивают интенсивность окраски раствора в пробах, отмечают, как изменилась скорость реакции при воздействии веществ. Проба с добавлением воды является контрольной.

Оформление работы

Отмечают принцип метода и ход работы. Результаты работы оформляют в виде таблицы. В выводах сравнивают скорость реакции в пробах и отмечают причину различий.

Пробы	Влияющий фактор	Окраска	Относительная скорость реакции
Опыт 1 Опыт 2 Контроль			

ТЕМА 3.2. РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

АКТУАЛЬНОСТЬ

Значительное количество лекарственных средств влияет на активность ферментов организма и знание роли тех или иных ферментов позволяет грамотно использовать медицинские препараты.

Исследование регуляции активности ферментов дает возможность их использования в лечебных или диагностических целях.

ЦЕЛЬ

Знакомство с особенностями ферментативного катализа и изучение регуляции активности ферментов в клетке.

Знакомство с методами обнаружения ферментов в тканях и биологических жидкостях, освоение метода определения активности амилазы в сыворотке крови.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Способы регуляции скорости ферментативных реакций в клетке (in vivo):

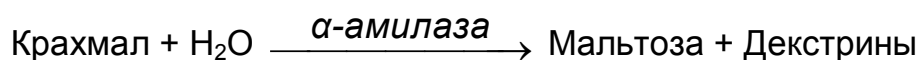
- компартиментализация;
 - изменение количества фермента – на примере влияния глюкокортикоидов на глюконеогенез;
 - изменение доступности субстрата на примере оксалоацетата и цикла трикарбоновых кислот;
 - проферменты и их ограниченный протеолиз на примере ферментов желудочно-кишечного тракта;
 - белок-белковое взаимодействие на примере активации аденилатциклазы (присоединение регуляторных белков) и на примере протеинкиназы А (диссоциация белка на протомеры). Схемы процессов;
 - аллостерические механизмы регуляции ферментов: а) схема изменения активности фермента при воздействии эффектора, б) роль аллостерической регуляции метаболизма на примере фосфофруктокиназы;
 - ковалентная модификация ферментов на примере ферментов гликогенсинтазы и гликогенфосфорилазы. Схема механизма регуляции.
2. Характеристика ингибирования ферментов. Конкурентное и неконкурентное ингибирование. Обратимое и необратимое ингибирование. Примеры.
 3. Применение ингибиторов ферментов в качестве лекарственных средств. Примеры.
 4. Определение активности амилазы в сыворотке крови и моче. Принцип метода. Клинико-диагностическое значение и нормальные величины.

Лабораторная работа 1

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И МОЧЕ

Принцип

α -Амилаза (диастаза, 1,4- α -D-глюкангидролаза, КФ 3.2.1.1.) катализирует гидролиз α -1,4-гликозидных связей крахмала и гликогена до мальтозы и декстринов.



Количество оставшегося крахмала, пропорциональное каталитической активности фермента, определяют по цветной реакции с йодом.

Реактивы

- 1) Субстрат, 0,04% р-р крахмала в дистиллированной воде,
- 2) 0,01 М рабочий раствор йода.

Материал исследования

Сыворотка крови. Моча.

Проведение анализа

	Опыт 1, мл	Опыт 2, мл	Контроль, мл
Раствор крахмала	1,0	1,0	1,0
Инкубируют при 37°C в течение 5 минут			
Сыворотка крови	0,02	—	—
Моча	—	0,02	—
Инкубируют при 37°C точно 5 минут			
0,01 М рабочий р-р йода	1,0	1,0	1,0
Холодная дистил. во- да	8,0	8,0	8,0
Перемешивают. Измеряют оптическую плотность опытных и контрольного растворов против воды при длине волны 540 нм (зеленый светофильтр)			

Расчет

$$\text{Активность амилазы, г/л·ч} = \frac{E_{\text{КОНТР}} - E_{\text{ОПЫТ}}}{E_{\text{КОНТР}}} \times 240, \text{ где}$$

$E_{\text{КОНТР}}$ и $E_{\text{ОПЫТ}}$ – соответственно оптическая плотность контрольной и опытных проб, 240 – коэффициент пересчета.

Нормальные величины

Сыворотка крови	16-30 г/л·ч
Моча	28-160 г/л·ч

Клинико-диагностическое значение

У здорового человека в крови содержится амилаза 2 изоферментных типов: панкреатическая – Р-тип (около 30%) и слюнная – S-тип (около 70%), которые попадают в кровь в результате естественного старения и отмирания клеток слюнных желез и поджелудочной железы. Фермент имеет относительно низкую молекулярную массу (около 48000 Д), фильтруется в почечных клубочках и присутствует в моче. Соотношение изоферментов в моче иное, чем в крови: Р-тип – 70%, S-тип – до 30%.

Сыворотка крови и моча

Повышение активности фермента в сыворотке крови и в моче происходит главным образом при заболеваниях поджелудочной железы. При остром панкреатите активность фермента в крови достигает максимума через 12-24 часа от начала заболевания (повышение в 10-30 раз) и при правильной терапии нормализуется на 2-6-е сутки. При хронических панкреатитах повышение активности фермента умеренное. Возрастание активности фермента выявляется также при поражении слюнных желез, холецистите, заболеваниях желчных путей, беременно-

сти, почечной недостаточности, кишечной непроходимости, диабетическом кетоацидозе, некоторых опухолях легких и яичников.

Снижение активности в клинической практике выявляется редко, обычно диагностического значения не имеет. Иногда отмечается у больных с заболеваниями печени (цирроз), злокачественными опухолями, гипотиреозом, кахексией, при токсикозе беременных.

Оформление работы

Отмечают принцип метода, ход работы, регистрируют результаты анализа, отмечают клинико-диагностическое значение и делают вывод о возможных патологиях.

ТЕМА 3.3. КЛАССИФИКАЦИЯ И НОМЕНКЛАТУРА ФЕРМЕНТОВ (СЕМИНАР)

АКТУАЛЬНОСТЬ

Ферменты – белковые молекулы, выполняющие в живой клетке функции биокатализаторов. Знание принципов классификации ферментов необходимо для изучения обмена веществ, для понимания их роли в осуществлении биохимических реакций.

ЦЕЛЬ

Знакомство с классификацией ферментов и с реакциями, характерными для каждого класса ферментов.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Роль ферментов и коферментов в катализе.
2. Коферментные формы витаминов (ТДФ, ФМН и ФАД, НАД⁺ и НАДФ⁺, ПФ).
3. Принципы современной классификации и номенклатуры ферментов: оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы, лигазы (синтетазы).
4. Характеристика каждого класса ферментов по плану:
 - название и номер класса;
 - биохимическая роль;
 - основные подклассы (1-3 подкласса);
 - основные коферменты данного класса;
 - правила систематического названия ферментов;
 - напишите примеры биохимических реакций данного класса ферментов (1-3 реакции).

ТЕМЫ ДЛЯ РЕФЕРАТИВНЫХ СООБЩЕНИЙ

1. Применение ферментов и их ингибиторов в качестве лекарственных средств.
2. Использование ферментов в промышленности, в биохимических и иммунологических исследованиях.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один правильный ответ.

1. ФЕРМЕНТ ОТ НЕБЕЛКОВОГО КАТАЛИЗАТОРА ОТЛИЧАЕТ ТО, ЧТО ОН
 - 1) снижает энергию активации
 - 2) не расходуется в результате реакции
 - 3) не претерпевает необратимых изменений
 - 4) обладает специфичностью
2. ПЕРЕНОС ГРУПП ВНУТРИ МОЛЕКУЛЫ КАТАЛИЗИРУЮТ
 - 1) изомеразы
 - 2) трансферазы
 - 3) лиазы
 - 4) гидролазы
3. ПРИСОЕДИНЕНИЕ ГРУПП ПО ДВОЙНЫМ СВЯЗЯМ И ОБРАТИМЫЕ РЕАКЦИИ СИНТЕЗА-РАСПАДА КАТАЛИЗИРУЮТ
 - 1) изомеразы
 - 2) лигазы
 - 3) лиазы
 - 4) трансферазы
4. АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗА ВХОДИТ В КЛАСС ФЕРМЕНТОВ
 - 1) оксидоредуктазы
 - 2) гидролазы
 - 3) лигазы
 - 4) трансферазы
5. ПРЕДСТАВИТЕЛЕМ КЛАССА ГИДРОЛАЗ ЯВЛЯЕТСЯ
 - 1) каталаза
 - 2) алкогольдегидрогеназа
 - 3) пепсин
 - 4) гемоглобин
6. СНИЖЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТА ПРИ ПОВЫШЕНИИ ТЕМПЕРАТУРЫ ВЫШЕ 50°C ОБУСЛОВЛЕНО
 - 1) денатурацией апофермента
 - 2) денатурацией кофермента
 - 3) распадом холофермента
 - 4) гидролизом
7. 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
8. 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
- КОВАЛЕНТНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ПРИ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ – ЭТО
 - 1) присоединение к нему какой-либо химической группы
 - 2) внутримолекулярная перестройка структуры фермента
 - 3) присоединение или удаление небольшого фрагмента от субстрата
 - 4) присоединение или удаление небольшого фрагмента от фермента
9. В ОТЛИЧИЕ ОТ НЕОРГАНИЧЕСКИХ КАТАЛИЗАТОРОВ ФЕРМЕНТЫ
- 1) ускоряют наступление реакции
 - 2) являются регулируемыми
 - 3) расходуются в процессе реакции
 - 4) не катализируют энергетически невозможные реакции

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

1. Обнаружено, что если аллостерический фермент аспарат:карбамоил-трансфераза (молекула состоит из 12 протомеров) выдержать в течение 4 минут при 60°C, то он теряет чувствительность к аллостерическому ингибитору (ЦТФ). При этом ферментативная активность сохраняется. Схожие свойства проявляют и другие аллостерические ферменты.

Предложите возможные механизмы подобного нарушения.

2. Объясните биохимический смысл некоторых требований (подчеркнуты), предъявляемых к хранению и использованию ферментных препаратов:

- растворение сухого препарата дистиллированной водой комнатной температуры.
- при растворении препарата перемешивать осторожно.
- хранение раствора препарата при низкой температуре.

- при необходимости длительного хранения – высушивание препарата и запаивание в вакуумированные ампулы.

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

Объясните, почему переход одной формы в другую сопровождается изменением активности.

Предположите, в каком состоянии липаза является активной, если известно, что выделяющийся при физической нагрузке гормон адреналин запускает каскад реакций, ведущих к фосфорилированию внутриклеточных белков.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ К ИТОГОВОМУ ЗАНЯТИЮ

1. Классификация аминокислот по биологической роли, по химическому строению, по физико-химическим свойствам, по растворимости в воде.
2. Строение протеиногенных аминокислот. Физико-химические свойства аминокислот. Понятие изоэлектрической точки.
3. Пептидная связь, реакция ее образования. Свойства пептидной связи.
4. Биологическая роль белков. Классификация белков по функции и строению. Физико-химические свойства белков и белковых растворов. Факторы, стабилизирующие белковую молекулу в растворе. Коллоидные свойства белков.
5. Влияние смещения pH на заряд аминокислот и белков. Факторы, вызывающие осаждение белков. Свойства денатурированного белка. Характерные особенности денатурации и ренативации.
6. Уровни структурной организации белковой молекулы. Типы связей, стабилизирующие структуру белковой молекулы. Аминокислоты, образующие эти связи.
7. Простые белки (альбумины, глобулины, гистоны, протамины), их представители, роль в организме.
8. Сложные белки: фосфопротеины, нуклеопротеины, гликопротеины и протеогликаны, хромопротеины, металлопротеины, липопротеины. Структура мононуклеотидов на примере АМФ, АДФ, АТФ, цАМФ. Формулы гема, гиалуроновой кислоты и хондроитинсульфатов.
9. Принцип цветных качественных реакций на аминокислоты и белки. Возможность использования в практике.
10. Удаление белков из раствора и очистка белковых растворов от примесей. Механизмы реакций. Использование в биохимии и медицине.
11. Методы осаждения белков, применимые для получения белков и ферментов в нативном состоянии.
12. Составление произвольных тетрапептидов с заданными свойствами, умение назвать их, определение суммарного заряда и растворимости, зоны pH, в которой находится их изоэлектрическая точка.
13. Определение составных компонентов фосфопротеинов и гликопротеинов.
14. Перечислите общие свойства витаминов, их классы. Провитамины и авитамины, приведите примеры. Общие причины возникновения гипо- и авитаминозов. Гипервитаминозы.
15. Характеристика жирорастворимых витаминов А, D₃, Е, К, F: физиологическое название, химическая структура витаминов А,

- D₂, D₃, E, K, F, активных форм витаминов A и D, суточная потребность, пищевые источники. Биохимические функции и процессы, в которых принимает участие витамин. Возможные причины и клинические проявления гипер-, гипо- и авитаминозов. Что такое каротиноиды? Укажите их роль в организме.
16. Характеристика водорастворимых витаминов B₁, B₂, B₃ (никотиновая кислота), B₅ (пантотеновая кислота), B₆, B₉, B₁₂, C, H: физиологическое название, строение (кроме витаминов B₁₂, фолиевой и пантотеновой кислот), суточная потребность, пищевые источники. Биохимические функции и реакции, в которых принимают участие витамины. Структурные формулы коферментов (для B₁, B₂, B₃, B₆). Возможные причины и клинические проявления гипо- и авитаминоза. Роль витаминов для правильного роста и развития ребенка.
 17. Механизм антибактериальной активности сульфаниламидных препаратов.
 18. Качественные реакции открытия витаминов A, E, K, D₃, B₁, B₂, B₃, B₆, B₁₂. Принцип методов, ход определения, практическое значение методов.
 19. Количественное определение витамина C в моче. Принцип метода, ход определения, клинико-диагностическое значение, нормальные показатели.
 20. Ферменты, их роль в осуществлении биохимических реакций. Сравните ферменты и неорганические катализаторы.
 21. Структурно-функциональная организация ферментов (уровень структуры, простые и сложные ферменты). Холофермент, апофермент, кофактор, кофермент, простетическая группа, активный и аллостерический центры. Роль апофермента и кофермента в катализе. Строение мультиферментных комплексов клетки.
 22. Особенности строения изоферментов. Общая характеристика и примеры изоферментов.
 23. Классификация ферментов. Основные подклассы в каждом классе. Номенклатура ферментов. Что такое классификационный номер? Примеры биохимических реакций, ферменты этих реакций.
 24. Этапы ферментативного катализа. Особенности ковалентного и кислотно-основного катализа.
 25. Количественное определение активности ферментов в биологических объектах. Единицы активности ферментов.
 26. Основные свойства ферментов, графики зависимости активности фермента от различных воздействий. Специфичность фермента, виды специфичности. Механизмы специфичности (теории Фишера и Кошланда).

27. Способы регуляции метаболической активности в клетке: компартиментализация, изменение концентрации фермента, изменение концентрации субстрата, наличие изоферментов, аллостерические механизмы регуляции ферментов, ковалентная модификация ферментов, проферменты и их ограниченный протеолиз, белок-белковое взаимодействие.
28. Основные виды ингибирования ферментов: конкурентное и неконкурентное, обратимое и необратимое. Примеры.
29. Использование ферментов в медицине. Энзимотерапия и энзимодиагностика. Использование ингибиторов ферментов в качестве лекарств. Примеры.
30. Отличие первичных и вторичных форм энзимопатий. Примеры.
31. Исследование скорости ферментативной реакции на примере каталазы.
32. Практическое обнаружение влияния температуры на активность ферментов на примере амилазы слюны и дегидрогеназы дрожжей. Принцип метода и ход определения.
33. Практическое обнаружение действия инактиваторов и активаторов ферментов на примере амилазы слюны. Принцип метода и ход определения.
34. Исследование специфичности действия ферментов на примере амилазы слюны и уреазы. Принцип метода и ход определения.
35. Принцип метода и ход определения активности амилазы в сыворотке крови и моче. Нормальные величины и клинико-диагностическое значение метода.

РАЗДЕЛ 4 БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ

ТЕМА 4.1. ОБЩИЕ ПУТИ КАТАБОЛИЗМА: ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ДЕКАРБОКСИЛИРОВАНИЕ ПИРУВАТА. ЦИКЛ ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ. ФЕРМЕНТЫ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ. ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ (СЕМИНАР)

АКТУАЛЬНОСТЬ

Биологическое окисление протекает во всех живых клетках организма в виде совокупных окислительных реакций. При этом происходит многократная передача протонов и электронов или только электронов от донора к акцептору. Конечными продуктами этого процесса являются вода окисления и диоксид углерода (H_2O и CO_2). Основной функцией биологического окисления является обеспечение организма энергией для процессов жизнедеятельности. Формой энергии, доступной для использования, является аденозинтрифосфорная кислота (АТФ).

Некоторые вещества, как лекарственные (барбитураты), так и токсические (цианиды, окись углерода), подавляют окислительное фосфорилирование и синтез АТФ.

ЦЕЛЬ

Изучение реакций пируватдегидрогеназного комплекса и цикла трикарбонных кислот, строения цепи дыхательных ферментов митохондрий и механизмов окислительного фосфорилирования.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Пластическая (анаболизм) и энергетическая (катаболизм) функции метаболизма.
2. Стадии катаболических превращений питательных веществ в организме, связанные с высвобождением свободной энергии. Чему равно высвобождение и запасание энергии на каждом из этапов?
3. Строение и функции митохондрий.
4. Химическая формула АТФ (аденозинтрифосфорная кислота), роль АТФ? Значение циклов АТФ – АДФ и НАДФН – НАДФ⁺.
5. Основные макроэнергетические соединения клетки – АТФ, 1,3-дифосфоглицерат, фосфоенолпируват, креатинфосфат, ацетил~S-КоА? Что такое субстратное фосфорилирование?
6. Источники ключевых продуктов метаболизма – ацетил~S-КоА и пировиноградной кислоты. Дальнейшая судьба веществ.

7. Строение мультиферментного пируватдегидрогеназного комплекса, его ферменты и коферменты. Суммарная реакция окислительного декарбоксилирования пировиноградной кислоты. Химизм пяти отдельных реакций. Регуляция процесса.
8. Реакции цикла трикарбоновых кислот (цикл Кребса, цикл лимонной кислоты). Механизм окисления ацетильной группы. Ферменты и коферменты процесса. Биологическое значение ЦТК. Роль оксалоацетата, НАДН и метаболитов ЦТК в регуляции скорости цикла.
9. Взаимосвязь ЦТК с катаболизмом углеводов, липидов, белков.
10. Характеристика процесса окислительного фосфорилирования по плану:
 - молекулярная организация и последовательность ферментных комплексов цепи переноса электронов, нарисуйте схему цепи дыхательных ферментов;
 - перенос электронов по комплексам дыхательной цепи, роль коферментов (ФМН, FeS-белки, коэнзим Q, гемовые группы цитохромов);
 - роль кислорода – конечного акцептора электронов восстановленных субстратов биологического окисления;
 - выкачивание протонов из матрикса митохондрий – участки трансмембранного переноса (участки сопряжения окисления и фосфорилирования), формирование электрохимического градиента;
 - строение АТФ-синтазы, роль электрохимического градиента в работе АТФ-синтазы.
11. Коэффициент фосфорилирования P/O. Его величина для НАДН и ФАДН₂. Расчет количества АТФ, полученной при окислении некоторых субстратов (аланин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты).
12. Комплексы ферментов дыхательной цепи, на которые могут действовать ингибиторы. Как ингибируется процесс окислительного фосфорилирования?
13. Разобщение окисления и фосфорилирования. Механизм этого явления. Вещества, вызывающие разобщение.
14. Бурая жировая ткань: ее функция, локализация. Функция белка термогенина. Его роль в термогенезе.
15. Причины гипознергетических состояний.
16. Регуляция окислительного фосфорилирования. Дыхательный контроль. Роль соотношения АТФ и АДФ в регуляции работы дыхательной цепи.
17. Примеры применения нуклеотидов (АТФ, АДФ, АМФ, ФМН) в качестве лекарственных препаратов.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите 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
 - 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
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. В ДЫХАТЕЛЬНОМ КОНТРОЛЕ ПРОЯВЛЯЕТСЯ ЗАВИСИМОСТЬ СКОРОСТИ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ ПО ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ ОТ
 - 1) соотношения концентрации АДФ и АТФ
 - 2) концентрации НАДН
 - 3) величины потребляемого кислорода
 - 4) активности АТФ-синтетазы
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 CO₂ и H₂O
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
8. СОЗДАНИЕ ПРОТОННОГО ГРАДИЕНТА НА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ МЕМБРАНЕ ОБУСЛОВЛЕНО
- 1) распадом АТФ
 - 2) окислением НАДН
 - 3) движением электронов
 - 4) выкачиванием ионов H^+ в обмен на Na^+
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 ВОС-СТАНОВЛЕННЫЕ ЭКВИВАЛЕНТЫ ИСПОЛЬЗУЮТСЯ
- 1) в цепи дыхательных ферментов
 - 2) в реакциях синтеза глюкозы, жирных кислот и т.д
 - 3) для работы АТФ-синтетазы
 - 4) для синтеза ацетил-КоА

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

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

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

Дайте мотивированный ответ.

2. Особая жировая ткань – бурый жир – имеется у некоторых животных, впадающих в зимнюю спячку или приспособленных к обитанию в холодных местностях. В митохондриях бурого жира выход АТФ на 1 атом поглощенного кислорода составляет менее 1 молекулы, в то время как других тканях 2-3 молекулы.

- *Какая физиологическая функция может определяться этим низким отношением Р/О в буром жире новорожденных?*
- *Каковы возможные механизмы, которые могли бы определять столь низкое отношение Р/О, характерное для митохондрий бурого жира?*

РАЗДЕЛ 5

ОБМЕН АМИНОКИСЛОТ И БЕЛКОВ

ТЕМА 5.1. ВНЕШНИЙ ОБМЕН БЕЛКОВ

АКТУАЛЬНОСТЬ

Источником белков для человека являются пищевые продукты животного и растительного происхождения. Отклонения состава пищеварительных соков от нормы или появление в них компонентов, не содержащихся в физиологических условиях, приводит к патологии пищеварения. Ухудшение переваривания белков и всасывания аминокислот может повлечь за собой недостаток синтеза белков в организме и нарушение деятельности органов и систем.

Методы анализа состава желудочного сока имеют большое значение для оценки переваривающей способности желудочного сока в норме и при патологии.

ЦЕЛЬ

Изучить ферменты, условия и механизмы переваривания белков в желудке и кишечнике.

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

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Повторите строение аминокислот и белков, роль пептидной связи в организации белковой молекулы.
2. Повторите класс ферментов "Гидролазы".
3. Понятие "азотистый баланс" и причины его изменения (равновесие, положительный и отрицательный азотистый баланс). Особенности азотистого баланса у детей.
4. Пищевые источники белка. Суточная потребность в белке у детей разного возраста и взрослых.
5. Биологическая ценность белков. Понятие эталонного белка. Клинические проявления белковой недостаточности у детей. Заболевание "квashiоркор".
6. Механизм синтеза и биологическая роль соляной кислоты желудочного сока. Понятия "гиперхлоргидрия", "гипохлоргидрия", "ахлоргидрия", "ахилия".
7. Переваривание белков в желудке и кишечнике. Характеристика ферментов желудочного сока (пепсин, гастриксин, химозин (реннин)), панкреатического сока (трипсин, химотрипсин, эластаза, карбоксипептидазы) и кишечного сока (аминопептидазы, дипептидазы) по плану:

- место синтеза;
 - механизм активации;
 - оптимальные условия для работы;
 - субстратная специфичность.
8. Вторичный активный транспорт аминокислот через клеточные мембраны.
9. Возрастные особенности переваривания белков и всасывания аминокислот у детей. Причины нарушения нормальных процессов переваривания и всасывания у детей и связь этих нарушений с развитием аллергических реакций. Причины и клинические проявления заболевания "целиакия".
10. Общая характеристика процесса "гниения белков" в толстом кишечнике. Причины и последствия этого процесса. Вещества, образующиеся при гниении белков.
11. Реакции превращения аминокислот под действием ферментов микрофлоры кишечника:
- реакции образования крезола и фенола;
 - реакции образования скатола и индола;
 - реакции образования кадаверина и путресцина;
 - источники метилмеркаптана и сероводорода.
12. Обезвреживание токсичных продуктов в печени: микросомальное окисление и система конъюгации. Какие ферменты участвуют в микросомальном окислении? Строение УДФ-глюкуроновой кислоты (УДФГК) и фосфоаденозинфосфосерной кислоты (ФАФС). Реакции образования животного индикана.
13. Качественные реакции на свободную соляную кислоту. Принцип методов. Нормальная величина pH желудочного сока, клинико-диагностическое значение определения pH в желудочном соке.
14. Определение общей кислотности, свободной и связанной соляной кислоты в желудочном соке. Принцип метода, нормальные показатели. Клинико-диагностическое значение исследования кислотности.
15. Качественная реакция на молочную кислоту в желудочном соке. Принцип метода и нормальные показатели. Клинико-диагностическое значение.
16. Обнаружение крови и гемоглобина в желудочном соке. Принцип метода. Нормальные показатели. Клинико-диагностическое значение.
17. Беззондовый метод определения кислотности желудочного сока (ацидотест). Клинико-диагностическое значение.

ТЕМЫ ДЛЯ РЕФЕРАТИВНЫХ СООБЩЕНИЙ

1. Заболевания желудочно-кишечного тракта, сопровождающиеся нарушением переваривания белков и всасывания аминокислот.

Оформление работы

Отмечают принцип методов, регистрируют результаты в таблице, отмечают клинко-диагностическое значение, делают вывод о наличии патологий.

Образец желудочного сока	Изменение окраски индикатора		Величина рН
	Конго красный	л-Диметиламиноазобензол	
1			
2			
3			

Лабораторная работа 2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕЙ КИСЛОТНОСТИ, СВОБОДНОЙ И СВЯЗАННОЙ СОЛЯНОЙ КИСЛОТЫ В ЖЕЛУДОЧНОМ СОКЕ

Под общей кислотностью желудочного сока понимают сумму всех кислореагирующих веществ: свободная соляная кислота, кислые фосфаты и органические кислоты (молочная, уксусная).

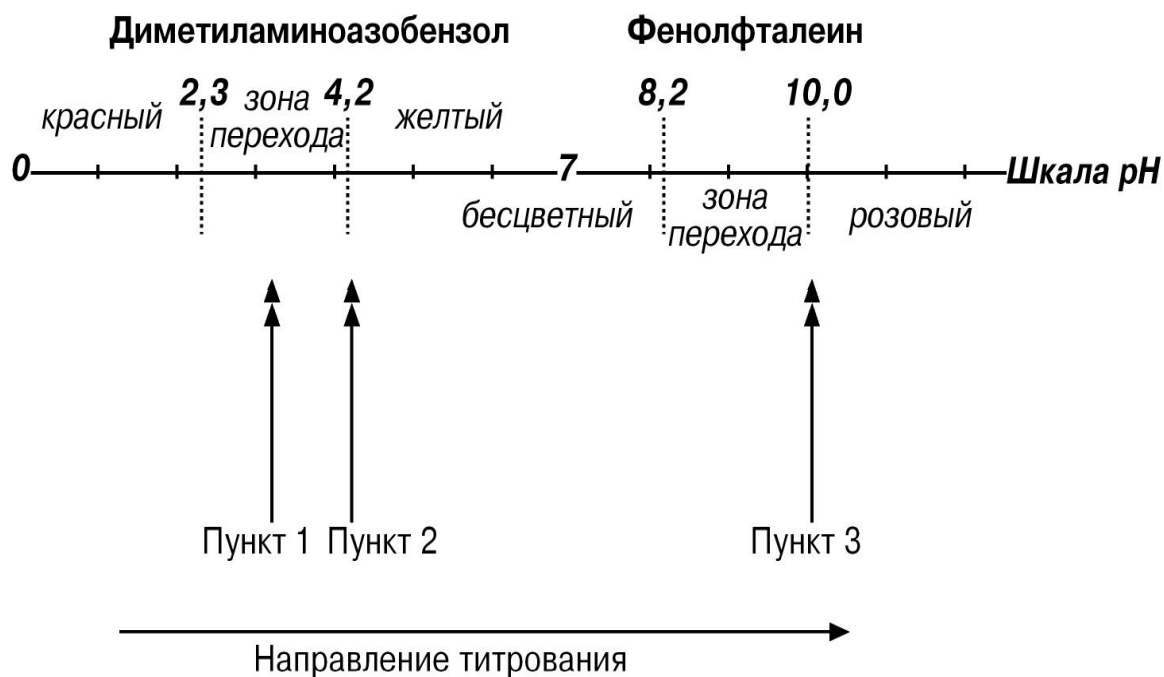
Соляная кислота, называемая "связанной", находится в солеобразном состоянии с белками и продуктами их переваривания.

Принцип

Метод основан на определении кислотных веществ желудочного сока путем титрования их раствором NaOH в присутствии двух индикаторов – диметиламиноазобензола (интервал перехода рН 2,3-4,2) и фенолфталеина (зона перехода рН 8,2-10,0).

В первую очередь с раствором NaOH взаимодействует свободная соляная кислота, поэтому по изменению рН от меньшей, чем 2,3, к большей, чем 4,2 (соответственно, окраски диметиламиноазобензола от красного к оранжевому), определяется количество свободной кислоты. Другие кислоты находятся в растворе в недиссоциированном состоянии и в реакцию со щелочью не вступают.

По переходу окраски фенолфталеина от отсутствия его цвета к розовому цвету (от рН меньшей, чем 8,2, к большей, чем 10,0) определяется общая кислотность желудочного сока.



Реактивы

1) 0,1 М р-р NaOH, 2) 1% спиртовой р-р фенолфталеина, 3) 0,5% спиртовой р-р п-диметиламиноазобензола.

Материал исследования

Образцы N 1, 2, 3 желудочного сока.

Проведение анализа

1. В коническую колбу помещают 5 мл исследуемого желудочного сока, добавляют по 2 капли диметиламиноазобензола и фенолфталеина.

- если в образце присутствует свободная HCl, то среда резко кислая и наблюдается красное окрашивание, обусловленное диметиламиноазобензолом. В данной порции желудочного сока можно определить **все виды кислотности** (выполняются пункты 2, 3, 4, см. ниже);
- если свободная HCl отсутствует, то среда слабокислая и наблюдается желтое окрашивание, обусловленное диметиламиноазобензолом. В этом образце можно определить только **общую кислотность** (выполняется сразу пункт 4, см. ниже).

2. Титруют 0,1 М раствором NaOH до появления оранжево-красной окраски и отмечают пункт 1 титрования, т.е. объем щелочи (мл), затраченной на титрование свободной HCl.

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

4. Далее титруют до появления розовой окраски и отмечают общее количество щелочи, затраченное на титрование – пункт 3 титрования.

Расчет

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

Пример расчета

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

а) содержание свободной HCl будет равно:

$$\text{Количество свободной HCl} = 2,0 \times \frac{0,1 \times 1000}{5,0} = 40 \text{ ммоль/л, где}$$

2,0 – количество мл раствора NaOH,
5,0 – количество мл желудочного сока, взятого для титрования,
0,1 – молярность раствора NaOH, 1000 – пересчет на 1 л;

б) содержание общей HCl рассчитывается исходя из среднего арифметического между пунктами 2 и 3 титрования:

$$\text{Количество общей HCl} = \frac{2,22 + 3,18}{2} \times \frac{0,1 \times 1000}{5,0} = 54 \text{ ммоль/л;}$$

в) содержание связанной HCl соответствует разности показателей общей и свободной соляной кислоты:

$$54 - 40 = 14 \text{ ммоль/л;}$$

г) общая кислотность желудочного сока рассчитывается, исходя из общего объема NaOH, затраченного на титрование:

$$\text{Общая кислотность} = 3,18 \times \frac{0,1 \times 1000}{5,0} = 63,6 \text{ ммоль/л}$$

Нормальные величины

Свободная HCl	20-40 ммоль/л
Связанная HCl	10-20 ммоль/л
Общая кислотность	40-60 ммоль/л

Клинико-диагностическое значение

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

Гиперхлоргидрия (увеличение содержания свободной HCl и общей кислотности) имеет место при гиперацидном гастрите и часто сопровождается язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки.

Гипохлоргидрия (пониженная кислотность) встречается при гипоацидном гастрите, иногда при язвенной болезни желудка. Как следствие, снижается усвоение витаминов группы В и всасывание железа, развивается железодефицитная анемия, активируются процессы гниения белков в кишечнике.

Ахлоргидрия (полное отсутствие соляной кислоты) и значительное снижение общей кислотности отмечается при атрофическом гастрите, пернициозной анемии, карциноме желудка. Диагноз ахлоргидрии ставится только после теста со стимуляцией секреции.

Так как при отсутствии соляной кислоты в желудке под влиянием микроорганизмов развиваются процессы брожения, то ахлоргидрия сопровождается появлением в желудке продуктов брожения – молочной, масляной, уксусной кислот, в результате у больных может быть неприятный запах изо рта.

Ахилия (отсутствие соляной кислоты и пепсина) связана со злокачественными новообразованиями желудка, пернициозной анемией.

Оформление работы

Отмечают принцип метода, ход работы, заносят в таблицу результаты анализа количества соляной кислоты и общей кислотности, отмечают клинико-диагностическое значение. Делают вывод о причинах выявленных нарушений.

Образец желудочного сока	Количество 0,1М NaOH, мл			Соляная кислота, ммоль/л			Общая кислотность, ммоль/л
	Пункт 1	Пункт 2	Пункт 3	своб-я	общая	связ-я	
1							
2							
3							

Лабораторная работа 3

КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА МОЛОЧНУЮ КИСЛОТУ В ЖЕЛУДОЧНОМ СОКЕ

Принцип

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

Реактивы

1) 1% р-р фенола, 2) 1% р-р FeCl₃, 3) 40% р-р молочной кислоты.

сока. Сопоставление окраски со шкалой служит количественным показателем кислотности.

Реактивы

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

Материал исследования

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

Проведение анализа

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

Через 1 час собирают "контрольную" мочу. После этого пациент, не разжевывая, проглатывает драже красителя и через 1,5 часа снова собирают мочу.

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

Оформление работы

Отмечают принцип метода и методику проведения анализа.

ТЕМА 5.2. ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ОБМЕН АМИНОКИСЛОТ

АКТУАЛЬНОСТЬ

Белки выполняют ряд уникальных функций, свойственных живой материи, поддерживая в значительной мере динамичное состояние между организмом и внешней средой. Свыше 20 природных аминокислот, часть из которых являются незаменимыми, включаются в общие и специфические пути превращения, что объясняет разнообразие и разветвленность метаболизма аминокислот.

В медицине описаны многочисленные случаи нарушения этапов обмена аминокислот.

ЦЕЛЬ

Изучить главные пути превращений аминокислот и транспортную систему их проникновения через клеточные мембраны.

Изучить основные реакции внутриклеточного обмена аминокислот (дезаминирование, трансаминирование, декарбоксилирование).

Научиться определять активность аминотрансфераз в сыворотке крови.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Транспорт аминокислот через клеточные мембраны.
2. Источники и пути превращений аминокислот в тканях. В чем особенность метаболизма глюкогенных и кетогенных аминокислот?
3. Виды дезаминирования аминокислот (восстановительное, гидролитическое, внутримолекулярное, окислительное).
4. Окислительное дезаминирование. Отличие прямого и непрямого окислительного дезаминирования.
5. Реакция прямого окислительного дезаминирования глутаминовой кислоты.
6. Непрямое окислительное дезаминирование – трансдезаминирование.
7. Механизм реакций трансаминирования. Роль витамина В₆. Строение витамина В₆ и его коферментных форм.
8. Значение реакций трансаминирования. Характеристика аспаратаминотрансферазы (АсАТ) и аланинаминотрансферазы (АлАТ). Реакции, катализируемые этими ферментами.
9. Особенности непрямого дезаминирования в мышечной ткани – цикл ИМФ-АМФ.
10. Судьба α -кетокислот, образовавшихся в процессах дезаминирования, на примере пирувата, оксалоацетата, α -кетоглутарата.
11. Реакции синтеза биогенных аминов (на примере γ -аминомасляной кислоты, гистамина, серотонина, дофамина). Роль этих биогенных аминов.
12. Способы обезвреживания биогенных аминов. Реакции дезаминирования с участием моноаминоксидазы (МАО) и реакции метилирования.
13. Анаболическая роль аминокислот на примере креатина. Строение креатина и креатинфосфата, реакции их синтеза, локализация процесса. Биологическая роль креатинфосфата. В чем причина физиологической креатинурии у детей?
14. Определение активности АсАТ и АлАТ в сыворотке крови. Принцип метода, его клинико-диагностическое значение. Нормальные показатели.

ТЕМЫ ДЛЯ РЕФЕРАТИВНЫХ СООБЩЕНИЙ

1. Анаболические процессы, в которых принимают участие аминокислоты. Использование аминокислот в медицинской практике.
2. Аминоацидурии, виды, этиология и патогенез, клинические проявления, основы лечения.

Лабораторная работа 1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИНОТРАНСФЕРАЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ

Принцип

В результате реакций трансаминирования, происходящих под действием аспартатаминотрансферазы (АсАТ, L-аспартат:2-оксоглутарат аминотрансфераза, КФ 2.6.1.1.) и аланинаминотрансферазы (АлАТ, L-аланин:2-оксоглутарат- аминотрансфераза, КФ 2.6.1.2.), из аспарагиновой кислоты и аланина образуются, соответственно, оксалоацетат и пируват. Оксалоацетат, подвергаясь самопроизвольному декарбоксилированию, превращается в пируват. При добавлении кислого 2,4-динитрофенилгидразина ферментативная реакция останавливается и образуется гидразон пировиноградной кислоты. Последний в щелочной среде дает бурое окрашивание, интенсивность которого пропорциональна количеству образовавшейся пировиноградной кислоты.

Реактивы

1) Р-р субстрата АсАТ: смесь α -кетоглутаровой кислоты и аспарагиновой кислоты, 2) р-р субстрата АлАТ: смесь α -кетоглутаровой кислоты и аланина, 3) р-р 2,4-динитрофенилгидразина в 1,0 М НСl, 4) 0,4 М р-р NaOH.

Стандартный р-р пировиноградной кислоты, 0,1 ммоль/л.

Материал исследования

Сыворотка крови.

Проведение анализа

	Проба 1, стандартная, мл	Проба 2, опытная для АлАТ, мл	Проба 3, опытная для АсАТ, мл
Субстратный р-р АлАТ	0,25	0,25	—
Субстратный р-р АсАТ	—	—	0,25
Стандартный раствор пировиноградной кислоты	0,05	—	—
Сыворотка крови	—	0,05	0,05
	Инкубируют 30 минут при 37°C		
2,4-ДНФГ	0,25	0,25	0,25
	Инкубируют при комнатной температуре в течение 20 минут		
NaOH	2,5	2,5	2,5
	Инкубируют при комнатной температуре в течение 10 минут. Колориметрируют опытные и стандартную пробы против воды при 540 нм (зеленый светофильтр)		

Расчет

$$\text{Активность АлАТ, ммС}_{\text{СТ}} \text{ оль/л}\cdot\text{ч} = \frac{E_{\text{оп2}}}{E_{\text{СТ}}} \times C_{\text{СТ}} \times 2$$

$$\text{Активность АсАТ, ммоль/л}\cdot\text{ч} = \frac{E_{\text{оп3}}}{E_{\text{СТ}}} \times C_{\text{СТ}} \times 2, \text{ где}$$

$E_{\text{СТ}}$, $E_{\text{оп2}}$, $E_{\text{оп3}}$ – соответственно оптическая плотность стандартной и опытных проб для АлАТ и АсАТ, $C_{\text{СТ}}$ – концентрация стандартного раствора, 2 – коэффициент перевода 30 минут в 1 час.

Нормальные величины

Сыворотка	Активность АлАТ	0,10-0,68 ммоль/л·ч
крови	Активность АсАТ	0,10-0,45 ммоль/л·ч
Коэффициент де Ритиса ($\frac{\text{Активность АсАТ}}{\text{Активность АлАТ}}$)		1,33±0,40

Клинико-диагностическое значение

Наиболее часто определение активности АсАТ и АлАТ используется в клинической практике для выявления патологических процессов в миокарде и печени.

В **миокарде** гораздо более высокая активность АсАТ, чем АлАТ. Повышение в крови активности обоих ферментов, особенно АсАТ, в остром периоде инфаркта миокарда является достоверным диагностическим тестом и имеется в 95% случаев. Активность АсАТ достигает максимума через 24-36 часов (обычно повышена в 4-5 раз) и при адекватном лечении снижается к 3-7-м суткам. При стенокардии активность ферментов в крови изменяется незначительно.

При поражении **печени** (токсический, сывороточный и инфекционный гепатит) в сыворотке крови высока активность также обоих ферментов, однако более выражено повышается активность АлАТ, чем АсАТ. При инфекционном гепатите активность ферментов повышается еще до появления желтухи. В половине случаев цирроза печени, однако, наблюдается более высокая активность АсАТ, чем АлАТ.

Коэффициент де Ритиса (отношение АсАТ/АлАТ) при инфаркте миокарда значительно увеличивается, при гепатитах снижается.

Оформление работы

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

ТЕМА 5.3. ПУТИ ПРЕВРАЩЕНИЯ АММИАКА И ЕГО ОБЕЗВРЕЖИВАНИЕ

АКТУАЛЬНОСТЬ

Непрерывное образование больших количеств аммиака в организме определяет необходимость его постоянного обезвреживания и выведения. Врожденные и приобретенные нарушения процессов обезвреживания аммиака вызывают серьезные клинические осложнения. Знание этих процессов необходимо для адекватной терапии заболеваний печени и почек, нарушений азотистого обмена.

ЦЕЛЬ

Изучить основные пути обезвреживания аммиака с образованием конечных продуктов белкового обмена.

Научиться определять содержание мочевины и креатинина в сыворотке крови и моче.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Основные источники аммиака в тканях. Реакции обезвреживания биогенных аминов, прямого дезаминирования глутаминовой кислоты.
2. Основные пути связывания аммиака в клетках:
3. реакция восстановительного аминирования (реаминирование), фермент и значение реакции;
4. реакции образования амидов глутаминовой и аспарагиновой кислот, отметьте их биологическое значение, опишите в каких органах проходят эти реакции;
5. реакция синтеза карбамоилфосфата.
6. Транспортные формы аммиака в крови (глутамин, аспарагин, аланин). Схема глюкозо-аланинового цикла.
7. Роль печени, почек и кишечника в связывании и выведении аммиака.
8. Реакции орнитинового цикла синтеза мочевины. Его локализация, ферменты, значение. Связь орнитинового цикла и ЦТК.
9. Представление о гипераммониемиях, их причинах и последствиях. Нормальный и предельно допустимый уровни концентрации аммиака в крови. Причины токсичности аммиака.
10. Аммониегенез, химизм, локализация, значение.
11. Креатин и креатинфосфата, реакции синтеза. Биологическая роль креатинфосфата.
12. Креатинин, реакция образования, выведение.
13. Количественное определение мочевины в сыворотке крови и моче. Принцип метода, его клинико-диагностическое значение, нормальные показатели.

14. Количественное определение концентрации креатинина в сыворотке крови и моче. Принцип метода, его клинико-диагностическое значение, нормальные показатели.

ТЕМЫ ДЛЯ РЕФЕРАТИВНЫХ СООБЩЕНИЙ

1. Гипераммониемии: причины, патогенез, клинические проявления, основы лечения. Гипераммониемия новорожденных. Молекулярные механизмы токсичности аммиака.

Лабораторная работа 1

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МОЧЕВИНЫ
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И МОЧЕ**

Принцип

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

Реактивы

1) Рабочий реактив: смесь FeCl₃, диацетилмонооксима, тиосемикарбазида, ортофосфорной кислоты и конц. H₂SO₄.

Стандартный раствор мочевины (16,65 ммоль/л).

Материал исследования

Сыворотка крови, моча (разведение 1:50).

Проведение анализа

Работа выполняется под тягой!

	Опыт 1, мл	Опыт 2, мл	Стандарт, мл
Сыворотка крови	0,01	—	—
Моча (разведение 1:50)	—	0,01	—
Стандартный рас- твор мочевины	—	—	0,01
Рабочий реактив	2,0	2,0	2,0
<p>Перемешивают. Закрывают крышкой из фольги. Помещают под тягу, выдерживают 20 минут в кипящей водяной бане и охлаждают под проточной водой.</p> <p>Измеряют оптическую плотность проб против воды при 540 нм (зеленый светофильтр) не позже чем через 15 минут после охлаждения.</p>			

Расчет

$$\text{Концентрация мочевины сыворотки, ммоль/л} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}}$$

$$\text{Концентрация мочевины мочи, ммоль/сут} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}} \times 50 \times D, \text{ где}$$

$E_{\text{оп}}$ и $E_{\text{ст}}$ – оптическая плотность опытной и стандартной проб, $C_{\text{ст}}$ – концентрация мочевины в стандартной пробе, 50 – разведение мочи, D – величина диуреза (1300-1500 мл/сут).

Нормальные величины

Сыворотка крови	дети	1,8-6,4 ммоль/л
	взрослые	2,5-8,3 ммоль/л
Моча		330-580 ммоль/сут

Клинико-диагностическое значение

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

Сыворотка крови

Повышение уровня мочевины в крови наблюдается при заболеваниях почек (нарушении выделительной функции), нарушении почечной перфузии (застойная сердечная недостаточность), истощении запасов воды в организме при рвоте, поносах (относительное повышение концентрации), при повышенном катаболизме белка (лихорадка, голодание), при диете с высоким содержанием белка.

Снижение концентрации отмечается при диете с низким содержанием белка, при повышенной утилизации белка в тканях (дети, поздние сроки беременности), тяжелых заболеваниях печени, сопровождающихся нарушением синтеза мочевины (паренхиматозная желтуха, гепатиты, цирроз печени).

Моча

Определение мочевины в моче позволяет следить за состоянием процессов анаболизма и катаболизма белков в организме (азотистый баланс).

Повышение концентрации мочевины в моче наблюдается при отрицательном азотистом балансе, при избыточном белковом питании, в послеоперационный период, при гиперфункции щитовидной железы, при лихорадке, голодании.

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

Оформление работы

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

Лабораторная работа 2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ КРЕАТИНИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И МОЧЕ

Принцип

Креатинин в щелочной среде образует с пикриновой кислотой пикрат креатинина оранжевого цвета. Интенсивность окраски раствора пропорциональна концентрации креатинина в биологической жидкости.

Реактивы

1) 10% р-р NaOH; 2) насыщенный р-р пикриновой кислоты; 3) 10% р-р трихлоруксусной кислоты (ТХУ).

Стандартный раствор креатинина, 177 мкмоль/л.

Материал исследования

Сыворотка крови, моча (разведение 1:50).

Проведение анализа

	Опыт 1, мл	Опыт 2, мл	Стандарт, мл
Сыворотка крови	0,5	—	—
Дистил. вода	1,0	—	—
10% р-р ТХУ	0,5	—	—
	Перемешивают, затем центрифугируют при 1500 об/мин или фильтруют, предварительно смочив фильтр дистиллированной водой		
Фильтрат	1,0	—	—
Дистил. вода	—	0,5	0,5
Моча (разведение 1:50)	—	0,5	—
Стандартный р-р креатинина	—	—	0,5
10% р-р NaOH	0,5	0,5	0,5
Насыщенный р-р пикриновой кислоты	0,5	0,5	0,5
	Перемешивают, через 20 минут измеряют оптическую плотность проб против воды при длине волны 540 нм (зеленый светофильтр).		

Расчет

$$\text{Концентрация креатинина сыворотки, мкмоль/л} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}} \times 2,$$

$$\text{Концентрация креатинина мочи, мкмоль/сут} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}} \times 50 \times Д,$$

где

$E_{\text{оп}}$ и $E_{\text{ст}}$ – оптическая плотность опытной и стандартной проб, $C_{\text{ст}}$ – концентрация креатинина в стандартной пробе, 2 – разведение сыворотки крови, 50 – разведение мочи, Д – величина диуреза (1300-1500 мл).

Нормальные величины

Сыворотка крови	дети до 1 года	18-35 мкмоль/л
	дети от 1 года до 12 лет	27-62 мкмоль/л
	женщины	44-97 мкмоль/л
	мужчины	52-132 мкмоль/л
Моча		4,4-17,7 ммоль/сут

Клинико-диагностическое значение

Сыворотка крови

Концентрация креатинина в крови здоровых людей относительно постоянна и зависит от состояния мышечной массы.

Повышение уровня креатинина в крови в 2-7 раз отмечается при острой почечной недостаточности, в особо тяжелых случаях – в 15-25 раз. Кроме того, выход креатинина из миоцитов в кровь выражен при гипертиреозе, сахарном диабете, мышечной дистрофии, обширных ожогах, при лихорадочных состояниях, частых внутримышечных инъекциях.

Уменьшение содержания креатинина в крови диагностического значения не имеет.

Моча

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

Снижение содержания креатинина в моче обнаруживается при хроническом нефрите и других заболеваниях почек, при мышечной атрофии, лейкозах и голодании.

Оформление работы

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

ТЕМА 5.4. ОСОБЕННОСТИ И НАРУШЕНИЯ ОБМЕНА НЕКОТОРЫХ АМИНОКИСЛОТ

АКТУАЛЬНОСТЬ

Помимо превращений, свойственных всем аминокислотам, имеются еще реакции, характерные для каждой аминокислоты. Образовавшиеся продукты могут играть важную, а иногда и решающую роль в процессах обмена веществ и определять физиологическое состояние организма. Известно более 100 болезней, обусловленных наследственными дефектами метаболизма аминокислот.

ЦЕЛЬ

Изучить основные пути превращений отдельных аминокислот: глицина, серина, цистеина, метионина, фенилаланина, тирозина, триптофана и дикарбоновых аминокислот и их нарушения.

Практическое знакомство с разделением аминокислот методом хроматографии. Знакомство с экспресс-методом диагностики фенилкетонурии.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Строение протеиногенных аминокислот.
2. Источники и общие пути превращений аминокислот в тканях.
3. Пути использования дикарбоновых аминокислот (глутаминовой и аспарагиновой) и их амидов в реакциях метаболизма. Связь обмена дикарбоновых аминокислот с циклом трикарбоновых кислот.
4. Синтез глюкозы из серина, аланина, глутаминовой и аспарагиновой кислот.
5. Пути использования цистеина и его серы. Реакции синтеза таурина. Характеристика заболевания "цистиноз", его причина, клинические проявления. Цистинурия и ее причины.
6. Использование глицина и серина в организме. Реакции взаимопревращения глицина и серина, роль тетрагидрофолиевой кислоты.
7. Взаимосвязь обмена глицина, серина, метионина и цистеина:
 - реакция синтеза S-аденозилметионина из S-аденозилгомоцистеина, его роль в процессах трансметилирования при синтезе ряда веществ;
 - реакция образования гомоцистеина и пути его дальнейших превращений;
 - участие витамина B₉ (фолиевой кислоты), витаминов B₆ (пиридоксина) и B₁₂ (цианкобаламина).
8. Причины гомоцистеинемии и гомоцистинурии. Каковы сопутствующие заболевания и основы лечения?

9. Пути использования фенилаланина и тирозина. Анаболические и катаболические пути превращений тирозина. Реакция превращения фенилаланина в тирозин.
10. Характеристика заболеваний фенилкетонурия I типа (классическая) и фенилкетонурия II типа (вариантная). Дефектные ферменты, клинические проявления, основы лечения.
11. Реакции катаболизма тирозина. Ферменты, дефект которых приводит к тирозинемии I типа (гепаторенальная), II типа (глазокожная), III типа (новорожденных), к алкаптонурии. Характерные особенности заболеваний и основы лечения.
12. Нарушения анаболической функции тирозина – альбинизм и паркинсонизм. Молекулярные причины, характерные особенности заболеваний, основы лечения.
13. Разделение аминокислот методом хроматографии на бумаге. Принцип метода. Практическое значение определения количества аминокислот в крови и моче.

ТЕМЫ ДЛЯ РЕФЕРАТИВНЫХ СООБЩЕНИЙ

1. Способы разделения веществ. Хроматография, ее виды. Применение разделения веществ в исследовательских и медицинских целях.
2. Искусственная почка. Гемодиализ. Принцип очищения крови и его использование при коррекции патологических состояний.
3. Фенилкетонурия, ее типы (классическая I типа, вариантная II и III типов). Материнская фенилкетонурия. Молекулярные причины, патогенез заболеваний, клинические проявления, основы лечения.
4. Катаболизм глицина до аммиака, углекислого газа или низкомолекулярных органических кислот (муравьиной, щавелевой). Глиоксилатный цикл. Нарушения катаболизма – гиперглицинемия, гипероксалатурия.
5. Катаболизм аминокислот с разветвленным радикалом (лейцин, изолейцин, валин). Болезни "моча с запахом кленового сиропа" и изовалератацидемия. Клинические проявления, основы лечения.
6. Метаболизм триптофана. Причины пеллагры при нарушении обмена триптофана. Болезнь Хартнупа. Клинические проявления, основы лечения.

Лабораторная работа 1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ МЕТОДОМ РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ НА БУМАГЕ

Хроматографические методы применяют для сорбционно-динамического разделения смесей аминокислот, белков, углеводов, липидов и их метаболитов. Существует множество видов хроматографии, каждый из которых имеет свои биохимические

основы. Достаточно точным и доступным является метод распределительной хроматографии (модификация адсорбционной хроматографии). В данной работе в качестве адсорбента используется специальная фильтровальная бумага.

Принцип

В основе распределительной хроматографии лежит различная растворимость аминокислот в полярных и неполярных растворителях. При использовании двух жидкостей, (полярная/неполярная), гидрофобные аминокислоты будут переходить в неполярную жидкость, гидрофильные аминокислоты – в полярную. Если какая-либо из этих жидкостей движется, то вместе с ней будут передвигаться соответствующие аминокислоты.

При хроматографии на бумаге вода (полярная жидкость) находится между целлюлозных волокон и является неподвижной полярной фазой. В качестве подвижной неполярной фазы используется органический растворитель бутанол.

При проведении анализа более гидрофобная аминокислота, лучше растворяющаяся в подвижном неполярном растворителе, движется с большей скоростью от линии старта, чем гидрофильная аминокислота, которая переходит в неподвижный водный слой. 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 и захватывает аминокислоты, которые распределяются концентрическими кругами и обнаруживаются после высушивания бумаги и проведения нингидриновой реакции.

Реактивы

Хроматографическая смесь (бутанол : уксусная кислота : вода, 1,5:1,5:1,0); 2) 0,2% спиртовой р-р нингидрина.

Материал исследования

Растворы аминокислот-свидетелей – глицина, аланина, лейцина (40 ммоль/л); исследуемые растворы 1, 2, 3, содержащие аминокислоты в различном сочетании.

Проведение анализа

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

Диск специальной хроматографической бумаги карандашом делят на 4 сектора и обозначают их согласно исходным растворам. На расстоянии 1,0 см от центра карандашом отмечают круговую линию старта. В центре листа хроматографической бумаги делают отверстие диаметром около 0,2 см и вставляют фитиль из скрученной полоски бумаги. Высота фитиля должна быть равна высоте чашки Петри.

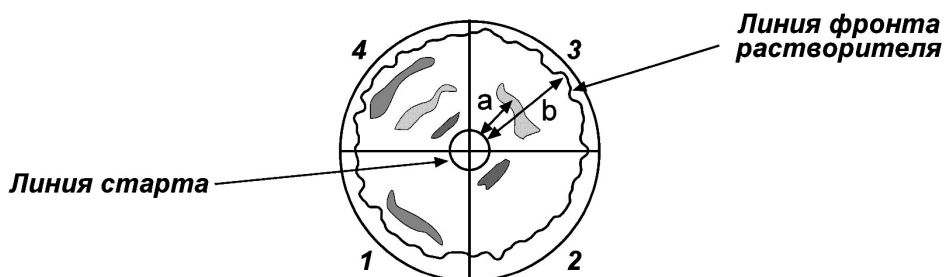
Стеклянными капиллярами на линию старта в секторах 1, 2, 3 наносят соответствующие растворы аминокислот-свидетелей и в сектор 4 – исследуемую смесь аминокислот.

Просушивают хроматограммы на воздухе до исчезновения влажных пятен. Хроматограмму помещают в заранее приготовленную чашку Петри (хроматографическую камеру), на 1/3 заполненную хроматографической смесью. Разделение проводят в закрытой чашке Петри, чтобы избежать испарения растворителя, при комнатной температуре под визуальным контролем (15-30 минут).

Когда фронт растворителя достигнет границ бумажного диска, разделение прекращают. Немедленно (!) карандашом обводят по всей окружности линию фронта растворителя.

Хроматограмму высушивают при температуре 90-100°C с целью устранения растворителей и фиксации аминокислот.

Далее хроматограмму опрыскивают раствором нингидрина, вновь выдерживают при 100°C. На бумаге проявляются красноватые, пурпурно-красные, в большинстве случаев синефиолетовые пятна, соответствующие расположению различных аминокислот.



Рассчитывают коэффициент распределения R_f для каждой аминокислоты:

$$R_f = \frac{a}{b}, \text{ где}$$

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

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

Практическое значение

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

моча дает обычно только после года жизни. До года положительный тест выявляется эпизодически (на максимуме выведения фенилкетонов), поэтому при подозрении на фенилкетонурию его следует повторять неоднократно. Производные фенилаланина появляются в моче также при поражениях печени (вирусный гепатит, отравление ядами).

Оформление работы

Записывают принцип метода, ход работы, используемый реактив и результаты анализа. Отмечают клинико-диагностическое значение и делают вывод о наличии возможных патологий.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите 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
2. **ДЛЯ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ ТОКСИЧНЫХ ВЕЩЕСТВ, ОБРАЗУЮЩИХСЯ В ТОЛСТОМ КИШЕЧНИКЕ, В ПЕЧЕНИ ПРИСУТСТВУЕТ ФЕРМЕНТ**
 - 1) гексокиназа
 - 2) аминотрансфераза
 - 3) глюкуронилтрансфераза
 - 4) сахараза
3. **ЭНТЕРОПЕПТИДАЗА ЯВЛЯЕТСЯ АКТИВАТОРОМ ФЕРМЕНТА**
 - 1) пепсиноген
 - 2) трипсиноген
 - 3) химотрипсиноген
 - 4) проэластаза
4. **ВЫСОКОАКТИВНЫЙ ФЕРМЕНТ ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗА СОДЕРЖИТ**
 - 1) никотинамидадениндинуклеотид (НАД)
 - 2) флавинадениндинуклеотид (ФАД)
 - 3) флавинмононуклеотид (ФМН)
 - 4) пиридоксальфосфат (ПАЛФ)
5. **СЕРОТОНИН В РЕАКЦИИ ДЕКАРБОКСИЛИРОВАНИЯ ОБРАЗУЕТСЯ ИЗ**
 - 1) гистидина
 - 2) триптофана
 - 3) тирозина
 - 4) 5-гидрокситриптофана

6. ОБРАЗОВАНИЕ γ -АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ КАТАЛИЗИРУЕТ
- 1) гистидиндекарбоксилаза
 - 2) тирозинмонооксигеназа
 - 3) глутаматдекарбоксилаза
 - 4) орнитиндекарбоксилаза
7. В СОСТАВ АМИНОТРАНСФЕРАЗЫ ВХОДИТ КОФЕРМЕНТ
- 1) никотинамидадениндинуклеотид
 - 2) флавинадениндинуклеотид
 - 3) тиаминдифосфат
 - 4) пиридоксальфосфат
8. СИНТЕЗ СОЛЯНОЙ КИСЛОТЫ В ЖЕЛУДКЕ СТИМУЛИРУЕТ
- 1) тирамин
 - 2) гистамин
 - 3) дофамин
 - 4) триптамин
9. ПРИ ГИПОВИТАМИНОЗЕ С НАРУШЕН ОБМЕН АМИНОКИСЛОТЫ
- 1) тирозина
 - 2) лейцина
 - 3) метионина
 - 4) цистеина
10. СВЯЗЫВАНИЕ АММИАКА ПРОИСХОДИТ ПРИ
- 1) синтезе глутамата из 2-оксоглутарата
 - 2) синтезе креатина
 - 3) трансаминировании аланина
 - 4) синтезе серотонина

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

1. Больного беспокоят боли в области желудка, отрыжка с неприятным запахом «тухлых яиц», урчание и газообразование в кишечнике.

Какие процессы могут быть причиной появления такого запаха? Что Вы порекомендуете для нормализации процессов пищеварения?

2. В эксперименте установлено, что добавка глутаминовой кислоты в раствор, питающий сердце, оказывает положительное воздействие на физиологическую функцию сердечной мышцы, особенно в условиях недостаточного обеспечения кислородом. *Объясните механизм положительного действия указанной аминокислоты на деятельность сердца.*

3. У пациента содержание мочевины в крови 2 ммоль/л, за сутки с мочой выведено 180 ммоль. *О нарушении функции какого органа можно думать? Какие ферменты необходимо исследовать для проверки предположения?*

РАЗДЕЛ 6

СТРОЕНИЕ И ОБМЕН ПУРИНОВЫХ И ПИРИМИДИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ

ТЕМА 6.1. СТРОЕНИЕ И МЕТАБОЛИЗМ ПУРИНОВЫХ И ПИРИМИДИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ

АКТУАЛЬНОСТЬ

Пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды выполняют ряд важнейших функций в клетке, одной из которых является построение нуклеиновых кислот. Нуклеиновые кислоты не являются незаменимыми пищевыми факторами, и поэтому большинство клеток организма способно к синтезу нуклеотидов. Синтез нуклеиновых кислот определяется скоростью обмена нуклеотидов.

К патологиям обмена пуриновых нуклеотидов относятся подагра, нефропатии и мочекаменная болезнь (образование уратных камней), синдром Леша-Нихана. К заболеваниям, связанным с нарушением обмена пиримидиновых нуклеотидов, относится оротатацидурия.

Нуклеотиды – лекарственные препараты (метилурацил, оротат калия) успешно применяются в спортивной медицине и в клинике с лечебной целью.

ЦЕЛЬ

Изучение биосинтеза и катаболизма пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, знакомство с нарушениями этих процессов.

Приобретение навыков обнаружения мочевой кислоты качественной реакцией и определения концентрации мочевой кислоты в сыворотке крови и моче.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Переваривание нуклеопротеинов в желудочно-кишечном тракте, ферменты. Дальнейшая судьба пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов и оснований.
2. Синтез пуриновых нуклеотидов:
 - реакции образования 5-фосфорибозиламина;
 - источники атомов азота и углерода пуринового кольца;
 - реакции синтеза АМФ и ГМФ из ИМФ;
 - реакции превращения АМФ в АТФ, ГМФ в ГТФ.
3. Регуляция синтеза пуриновых нуклеотидов по механизму обратной отрицательной связи. Перекрестная положительная регуляция с участием АТФ и ГТФ.
4. Катаболизм пуриновых нуклеотидов:
 - реакции распада АМФ;
 - реакции распада ГМФ;

- реакция образования мочевой кислоты из гипоксантина и ксантина, роль ксантиноксидазы.
5. Первичные и вторичные гиперурикемии:
 - мочекаменная болезнь, причины, основы лечения;
 - подагра, причины, клинические проявления, основы лечения. Механизм действия аллопуринола при лечении подагры.
 6. Синдром Леша-Нихана, причины, основы лечения, прогноз.
 7. Синтез пиримидиновых нуклеотидов:
 - реакции синтеза УМФ и УТФ.
 - реакции синтеза ЦТФ из УТФ.
 8. Регуляция синтеза пиримидиновых нуклеотидов по механизму обратной отрицательной связи.
 9. Синтез дезоксирибонуклеотидов. Роль тиоредоксина и НАДФН.
 10. Синтез dТМФ. Роль тетрагидрофолиевой кислоты. Причина развития мегалобластической анемии при дефиците фолиевой кислоты. Механизм антибактериальной активности сульфаниламидных препаратов.
 11. Катаболизм пиримидиновых нуклеотидов. Конечные продукты процесса.
 12. Заболевания, связанные с пиримидиновым обменом. Оротатацидурия, причина, клинические проявления, основы лечения.
 13. Использование в медицине ингибиторов синтеза пиримидиновых и пуриновых нуклеотидов на примере метотрексата, 5-фторурацила, азидотимидина.
 14. Качественная реакция на мочевую кислоту, принцип метода, его практическое значение.
 15. Количественное определение концентрации мочевой кислоты в сыворотке крови и моче. Принцип метода, клинико-диагностическое значение, нормальные показатели.

ТЕМЫ ДЛЯ РЕФЕРАТИВНЫХ СООБЩЕНИЙ

1. Подагра: этиология, молекулярные механизмы развития, клинические проявления, лечение.
2. Мочекаменная болезнь: этиология, виды мочевых камней, диагностика и клинические проявления, лечение.
3. Ферменты синтеза рибо- и дезоксирибонуклеотидов как мишени для противовирусных и противоопухолевых препаратов.

Лабораторная работа 1

КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА МОЧЕВУЮ КИСЛОТУ

Принцип

Мочевая кислота при окислении превращается в соединения (диалуровая кислота, аллоксан), которые конденсируются в аллоксантин. Аллоксантин, взаимодействуя с аммиаком, образует аммонийную соль (мурексид) кирпично-красного цвета. При добавлении KOH к мурексиду образуется калиевая соль сине-фиолетового цвета.

Реактивы

1) Конц. HNO₃, 2) конц. р-р NH₄OH (аммиак), 3) 10% р-р KOH.

Материал исследования

Кристаллы мочевой кислоты.

Проведение анализа

Кристаллы мочевой кислоты помещают на дно фарфоровой чашки, смачивают каплями азотной кислоты (осторожно!), выпаривают досуха под тягой при температуре не выше 70°C. Появляется коричнево-красное пятно.

После охлаждения осторожно на один край пятна наносят 1 каплю раствора аммиака, наблюдают окрашивание в пурпурно-красный цвет. С другого края пятна наносят 1 каплю раствора KOH – появляется сине-фиолетовое окрашивание.

Клинико-диагностическое значение

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

Оформление работы

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

Лабораторная работа 2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ МОЧЕВОЙ КИСЛОТЫ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

Ферментативное определение концентрации мочевой кислоты в сыворотке крови и моче

Принцип

Мочевая кислота расщепляется ферментом уриказой до аллантоина с одновременным образованием пероксида водорода. Последний при участии пероксидазы взаимодействует с дихлор-гидроксибензолсульфонатом и 4-аминоантипирином с образованием окрашенных в розово-малиновый цвет продуктов.

Интенсивность окраски пропорциональна содержанию мочевой кислоты и определяется фотоколориметрически.

Реактивы

1) Рабочий реактив, содержащий фенол, уриказу, пероксидазу, дихлоргидроксибензолсульфонат и 4-аминоантипирин в калиево-фосфатном буфере.

Стандартный раствор мочевой кислоты, 500 мкмоль/л.

Материал исследования

Сыворотка крови. Моча (разведение 1:5).

Проведение анализа

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

Расчет

$$\text{Конц-я мочевой кислоты сыворотки, мкмоль/л} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}},$$

$$\text{Конц-я мочевой кислоты мочи, ммоль/сут} = \frac{E_{\text{оп}} \times 5 \times Д}{E_{\text{ст}} \times 1000} \times C_{\text{ст}}, \text{ где}$$

$E_{\text{оп}}$ и $E_{\text{ст}}$ – оптическая плотность опытной и стандартной проб,
 $C_{\text{ст}}$ – концентрация мочевой кислоты в стандартной пробе,
 5 – разведение мочи, 1000 – коэффициент пересчета мкмоль в ммоль, Д – суточный диурез (1300-1500 мл).

Нормальные величины

Сыворотка крови	дети	0,12-0,32 ммоль/л
	взрослые	0,16-0,45 ммоль/л
Моча		1,46-4,43 ммоль/сут

Клинико-диагностическое значение

Сыворотка крови

Уровень уратов в крови (мононатриевая соль в комплексе с белком) определяется интенсивностью синтеза мочевой кислоты и скоростью ее выведения из организма. Белки сыворотки стабилизируют ураты, но при снижении pH ураты кристаллизуются в тканях.

Для **первичной** гиперурикемии выделяют метаболический (наиболее частый) и почечный типы. *Метаболический* тип является следствием усиления синтеза пуриновых нуклеотидов, например, повышенная активность фосфорибозилдифосфатсинтетазы или недостаточная активность гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы. *Почечный* тип может быть при генетически обусловленном уменьшении экскреции мочевой кислоты почками.

Вторичная гиперурикемия наблюдается при всех состояниях, связанных с усиленным распадом нуклеопротеинов: лейкозы, лечение цитостатиками, облучение, обширный псориаз, пернициозная анемия, гемолитическая анемия. Наиболее частой причиной является почечная недостаточность с нарушением процессов фильтрации и канальцевой секреции мочевой кислоты. Также замедление выведения уратов из организма отмечается при микседеме, гиперпаратиреозе, сахарном диабете, гестозе.

Обнаружение **гипоурикемии** диагностически мало значимо, иногда отмечается при анемии, после приема салицилатов, при избытке кортикотропина.

Моча

См. ниже.

Титрометрическое определение мочевой кислоты в моче

Принцип

Мочевая кислота восстанавливает фосфорно-вольфрамовый реактив, при этом развивается синяя окраска, интенсивность которой пропорциональна содержанию мочевой кислоты. Концентрацию образовавшейся фосфорновольфрамовой сини определяют путем ее титрования красной кровяной солью $K_3[Fe(CN)_6]$, которая окисляет фосфорно-вольфрамовую синь в бесцветное соединение.

Реактивы

1) 20% р-р Na_2CO_3 , 2) фосфорно-вольфрамовый реактив, 3) 3,992 моль/л раствор $K_3[Fe(CN)_6]$.

Материал исследования

Нормальная моча и моча с добавлением мочевой кислоты (пробы 1 и 2 соответственно).

Проведение анализа

В 2 колбы наливают по 5 мл нормальной и мочи с добавлением мочевой кислоты, добавляют по 2 мл фосфорновольфрамового реактива и по 10 мл раствора Na_2CO_3 , перемешивают. Из бюретки (осторожно!) по каплям добавляют раствор $K_3[Fe(CN)_6]$ до исчезновения синего оттенка и появления желтого окрашивания.

Расчет

Концентрация мочевой кислоты, ммоль/сут = $\frac{C_{\text{СТ}} \times A \times Д}{В}$, где

$C_{\text{СТ}}$ – концентрация стандартного раствора мочевой кислоты, соответствующая 1 мл раствора $K_3[Fe(CN)_6]$, $C_{\text{СТ}} = 0,004$ ммоль/л или 4 ммоль/мл, В – объем мочи, взятый для анализа (мл), А – количество мл раствора $K_3[Fe(CN)_6]$, пошедшего на титрование, Д – суточный диурез (1300-1500 мл).

Нормальные величины

Моча	обычная диета	1,46-4,43 ммоль/сут
	мясная диета	2,36-5,90 ммоль/сут

Клинико-диагностическое значение

Моча

Повышение содержания мочевой кислоты в моче наблюдается при гиперурикемии непочечного происхождения. Также повышают экскрецию уратов салицилаты, соли лития.

Уменьшают концентрацию мочевой кислоты злоупотребление алкоголем, отравление солями тяжелых металлов, заболевания почек.

Так как при подагре мочевая кислота откладывается в тканях, суставных сумках, хрящах, сухожилиях, ее суточное количество в моче иногда может снижаться.

Оформление работы

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

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один правильный ответ.

1. СОЕДИНЕНИЕ, ЯВЛЯЮЩЕЕСЯ ДОНОРОМ АЗОТА В СИНТЕЗЕ ПИРИМИДИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ, ЭТО
 - 1) глицин
 - 2) аспарагин
 - 3) аспартат
 - 4) глутамат
2. СОЕДИНЕНИЕ, ЯВЛЯЮЩЕЕСЯ ДОНОРОМ УГЛЕРОДА В СИНТЕЗЕ ПУРИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ, ЭТО
 - 1) аспарагиновая кислота
 - 2) формил-ТГФК
 - 3) глутамин
 - 4) триптофан

3. РЕГУЛЯТОРНЫМ ФЕРМЕНТОМ СИНТЕЗА ПИРИМИДИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ ЯВЛЯЕТСЯ
- 1) ксантиноксидаза
 - 2) карбамоилфосфатсинтетаза II
 - 3) дигидрооротаза
 - 4) карбамоилфосфатсинтетаза I
4. ПРИЧИНАМИ ЭФФЕКТИВНОСТИ АЛЛОПУРИНОЛА ПРИ ЛЕЧЕНИИ ПОДАГРЫ ЯВЛЯЕТСЯ
- 1) конкурентное ингибирование ксантиноксидазы
 - 2) понижение концентрации гипоксантина в моче
 - 3) увеличивает скорость выведения мочевой кислоты почками
 - 4) уменьшает скорость образования пуриновых оснований
5. АНТИВИТАМИНЫ ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ БЛОКИРУЮТ РЕАКЦИИ
- 1) образования dТМФ из dУМФ
 - 2) образования оротовой кислоты
 - 3) синтеза карбамоилфосфата
 - 4) образование ЦТФ из УТФ
6. ИНГИБИТОРОМ КАРБАМОИЛФОСФАТСИНТЕАЗЫ II ЯВЛЯЕТСЯ
- 1) ЦТФ
 - 2) ГМФ
 - 3) dАТФ
 - 4) 5-фосфорибозил-1-пирофосфат
7. К РАЗВИТИЮ ОРОТАЦИДУРИИ ПРИВОДИТ ДЕФЕКТ ФЕРМЕНТА
- 1) карбамоилфосфатсинтетаза I
 - 2) карбамоилфосфатсинтетаза II
 - 3) ксантиноксидаза
 - 4) ОМФ-декарбоксилаза
8. КОНЕЧНЫМ ПРОДУКТОМ РАСПАДА ПУРИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ ЯВЛЯЕТСЯ
- 1) мочевины
 - 2) мочевая кислота
 - 3) молочная кислота
 - 4) малоновая кислота
9. ПРИ РАСПАДЕ ПИРИМИДИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ ОБРАЗУЕТСЯ
- 1) ацетил-S-КоА
 - 2) урат натрия
 - 3) ксантин
 - 4) β -аминоизомасляная кислота

10. У БОЛЬНЫХ С СИНДРОМОМ ЛЕША-НИХАНА ИМЕЕТСЯ
ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ДЕФЕКТ

- 1) ксантиноксидазы
- 2) гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы
- 3) гексозо-1-фосфат-уридилтрансферазы
- 4) фосфорибозилдифосфат-синтетазы

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

1. Ребенок в возрасте 1 год поступил в детскую больницу с явлениями отсталости физического и умственного развития. При исследовании мочи выявлена высокая концентрация мочевой кислоты.

Какова причина ее появления?

2. При недостатке в рационе фолиевой кислоты развиваются мегалобластическая анемия, лейкопения, нарушается состояние слизистых оболочек и кожи.

В чем биохимическая причина таких нарушений?

РАЗДЕЛ 7

МАТРИЧНЫЕ БИОСИНТЕЗЫ

ТЕМА 7.1. СИНТЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ЕГО РЕГУЛЯЦИЯ

АКТУАЛЬНОСТЬ

Нуклеиновые кислоты отвечают за хранение и передачу наследственной информации. Ошибки, возникающие в процессе репликации и репарации ДНК, биосинтеза белка приводят к появлению аномального продукта и нарушению биохимических процессов в клетке. Этиология и патогенез многих заболеваний обусловлены наличием подобных наследственных или приобретенных ошибок.

ЦЕЛЬ

Изучение основных этапов биосинтеза нуклеиновых кислот.

Научиться выделять компоненты нуклеопротеинов из дрожжей и проводить качественные реакции для их обнаружения.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Структура нуклеиновых кислот ДНК и РНК. Строение нуклеопротеинов. Виды гистонов, особенности их строения и роль. Негистоновые белки, их функция.
2. Строение рибосом, их роль в клетке.
3. Биосинтез ДНК (репликация) у эукариот по плану:
 - суммарное уравнение,
 - связь с фазами клеточного цикла,
 - локализация процесса,
 - компоненты ДНК-синтезирующей системы,
 - основные этапы, последовательность реакций, субстраты и ферменты,
 - конечные продукты,
 - источники энергии для синтеза,
 - схема репликативной вилки, укажите расположение фрагментов Оказаки и каждого фермента репликации с учетом его функции.
4. Репарация ДНК, значение процесса.
5. Биосинтез РНК (транскрипция) у эукариот по плану:
 - суммарное уравнение,
 - связь с фазами клеточного цикла,
 - локализация процесса,
 - компоненты РНК-синтезирующей системы,
 - основные этапы, последовательность реакций, субстраты и ферменты,
 - конечные продукты,

- источники энергии для синтеза,
 - схема транскрипционной вилки, укажите положение промотора, ТАТА-бокса, терминатора и РНК-полимеразы.
6. Регуляция транскрипции у прокариот путем индукции синтеза (схема Жакоба-Моно) на примере лактозного оперона и путем репрессии синтеза на примере триптофанового оперона.
 7. Основные способы регуляции транскрипции у эукариот.
 8. Процессинг матричной РНК: сплайсинг, экзонирование, присоединение поли-А-последовательности.
 9. Вторичная структура транспортной РНК, понятие о процессинге тРНК. Локализация в тРНК и роль модифицированных нуклеотидов (псевдоуридил, дигидроуридил). Адапторная роль тРНК.
 10. Понятие о процессинге рибосомальной РНК. Типы рРНК у эукариот. Функция рРНК.
 11. Использование ингибиторов биосинтеза РНК и ДНК в качестве лекарственных препаратов на примере доксорубина, мелфалана, новобиоцина, рифамицина. В чем состоит механизм их действия?
 12. Анализ химического состава сложных белков – нуклеопротеинов. Принцип метода.

ТЕМЫ ДЛЯ РЕФЕРАТИВНЫХ СООБЩЕНИЙ

1. Генная инженерия, сущность, значение. Использование генной инженерии для получения лекарственных средств.
2. Генномодифицированные пищевые продукты. Перспективы развития, проблемы и решения.
3. Клонирование организмов, сущность, значение. Потенциальные возможности использования в медицине.
4. Гибридизация нуклеиновых кислот, сущность, значение. Использование в медицине и биологии.
5. Рибозимы: строение, классификация, свойства. Рибозимы как лекарственные препараты.

Лабораторная работа 1

АНАЛИЗ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА НУКЛЕОПРОТЕИНОВ

В составе нуклеопротеинов выделяют белковую часть, пуриновые или пиримидиновые основания, углеводы рибозу и дезоксирибозу, фосфорную кислоту. В работе определяется наличие всех перечисленных компонентов.

Реактивы

- 1) 1% р-р тимола в этиловом спирте, 2) 10% р-р NaOH,
- 3) конц. NH₄OH (аммиак), 4) молибденово-кислый аммоний,
- 5) конц. H₂SO₄, 6) 1% р-р CuSO₄, 7) 1% аммиачный р-р AgNO₃.

Материал исследования

Гидролизат пекарских дрожжей.

Проведение анализа

1. Подготовительный этап (выполняет лаборант)

Приготовление гидролизата пекарских дрожжей: 1 г дрожжей кипятят в течение часа в колбе с обратным холодильником в присутствии 20 мл 1% раствора H_2SO_4 и 20 мл дистиллированной воды. Фильтруют.

Цветные реакции

Биуретовая реакция	<p><i>Принцип</i> Белок с сульфатом меди в щелочной среде образует комплексное соединение с развитием розово-фиолетового или сине-фиолетового окрашивания</p> <p><i>Проведение реакции</i> К 5 каплям гидролизата добавляют 10 капель 10% раствора NaOH и 1 каплю 1% раствора $CuSO_4$</p>
Серебряная проба на пуриновые основания	<p><i>Принцип</i> Пуриновые основания (аденин и гуанин) при взаимодействии с нитратом серебра образуют через 5-10 минут рыхлый светло-коричневый осадок серебряных солей</p> <p><i>Проведение реакции</i> К 10 каплям гидролизата добавляют 10 капель конц. раствора аммиака, 10 капель 1% аммиачного раствора нитрата серебра. При стоянии образуется осадок с характерной окраской</p>
Реакция Молиша на углеводные группы (β-D-рибоза)	<p><i>Принцип</i> После дегидратации серной кислотой из пентоз образуется гидроксиметилфурфурол. При конденсации тимола с гидроксиметилфурфуролом развивается красное окрашивание</p> <p><i>Проведение реакции</i> К 10 каплям гидролизата добавляют 2 капли раствора тимола, перемешивают и осторожно по стенке добавляют конц. H_2SO_4. Наблюдают появление розового кольца в пробирке</p>
Молибденовая проба на фосфорную кислоту	<p><i>Принцип</i> Присутствующая в гидролизате дрожжей фосфорная кислота, взаимодействуя с молибденово-кислым аммонием в азотной кислоте, образует окрашенное в лимонно-желтый цвет комплексное соединение аммония фосфомолибдата</p> <p><i>Проведение реакции</i> К 10 каплям гидролизата добавляют 20 капель молибденового реактива. Нагревают в кипящей водяной бане. После охлаждения пробирки в струе воды фосфомолибдат аммония выпадает в осадок лимонно-желтого цвета</p>

Оформление работы

Результаты работы заносят в таблицу. Делают вывод о составе нуклеопротеинов:

Объект иссл-я	Сложные белки	Выявляемый компонент	Окрашива- ние	Вывод о присутствии
Дрожжи	Нуклео- протеины	Белок		
		Пуриновые основания		
		Пентозы		
		Фосфорная кислота		

ТЕМА 7.2. БИОСИНТЕЗ БЕЛКА И ЕГО РЕГУЛЯЦИЯ

АКТУАЛЬНОСТЬ

Белки, как и другие компоненты клетки, находятся в состоянии динамического равновесия, то есть непрерывно обновляются. Знание механизма биосинтеза белка и принципов его регуляции необходимо для понимания молекулярных основ и рационального использования антибиотических и химиотерапевтических средств.

ЦЕЛЬ

Изучить основные этапы биосинтеза белка и механизмы его регуляции.

Познакомиться с методами определения концентрации белка в сыворотке крови и моче.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Строение протеиногенных аминокислот, нуклеиновых кислот ДНК и РНК. Как построены рибосомы, какова их роль в клетке?
2. Генетический код, его свойства.
3. Адапторная роль транспортной РНК. Синтез аминоксил-тРНК, специфичность аминоксил-тРНК-синтетазы.
4. Характеристика биосинтеза белка по плану:
 - суммарное уравнение,
 - связь с фазами клеточного цикла,
 - локализация процесса,
 - компоненты белок-синтезирующей системы
 - основные этапы, последовательность реакций и ферменты,
 - конечные продукты,
 - источники энергии для синтеза.

5. Посттрансляционная модификация белковых молекул. Примеры белков, созревающих при участии этих процессов. Что такое фолдинг, в чем состоит роль шаперонов?
6. Лекарственные препараты как ингибиторы биосинтеза белка. Механизм действия на примере тетрациклинов, левомицетина, эритромицина, стрептомицина.
7. Количественное определение белка в сыворотке крови биуретовым и рефрактометрическим методами. Принцип методов, клиничко-диагностическое значение и нормальные показатели.
8. Определение содержания белка в моче методом Роберстса-Стольникова. Проба с сульфосалициловой кислотой. Принцип методов. Клиничко-диагностическое значение. Нормальные показатели.

ТЕМЫ ДЛЯ РЕФЕРАТИВНЫХ СООБЩЕНИЙ

1. Шапероны. Их виды, строение, участие в стабилизации и созревании белковой молекулы. Фолдинг белков.
2. Прионы. Их происхождение и свойства. Прионные болезни.
3. Лекарственные препараты как ингибиторы матричного биосинтеза РНК, ДНК и белка. Механизм действия лекарств.

Лабораторная работа 1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Биуретовый метод

Принцип

Пептидная связь в щелочной среде образует с медью комплексное соединение (биуретовая реакция). Интенсивность развивающегося сине-фиолетового окрашивания пропорциональна содержанию белка.

Материал исследования

Сыворотка крови.

Реактивы

- 1) Биуретовый реактив: смесь CuSO_4 и NaOH ; 2) 0,9% р-р NaCl . Стандартный р-р альбумина, 70 г/л.

Проведение анализа

	Опыт, мл	Стандарт, мл
Сыворотка крови	0,04	—
Стандартный раствор альбумина	—	0,04
Биуретовый реактив	3,0	3,0
Выдерживают 15 минут. Измеряют оптическую плотность проб против воды на ФЭК при длине волны 540 нм (зеленый светофильтр)		

Расчет

$$\text{Концентрация белка, г/л} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}}, \text{ где}$$

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

Нормальные величины

Сыворотка крови	дети от 1 года до 3 лет	54-85 г/л
	старшие дети и взрослые	65-85 г/л

Клинико-диагностическое значение

См. ниже.

Рефрактометрический метод

Принцип

При переходе из одной прозрачной среды (стекло) в другую (сыворотка крови) под наклоном к поверхности раздела двух фаз луч света преломляется. При этом отношение синуса угла падения к синусу угла преломления называется коэффициентом преломления (рефракции). В сыворотке крови величина рефракции зависит от количества и состава белков.

Материал исследования

Сыворотка крови.

Оборудование

Рефрактометр.

Реактивы

1. Проверяют нулевую точку прибора путем определения показателя преломления дистиллированной воды.

Для этого на чистую поверхность измерительной призмы наносят 2-3 капли воды и опускают осветительную призму. Наводят окуляр на резкость. Поворотом рефрактометра к свету добиваются наилучшей освещенности шкалы и штриха. Вращением маховичка "И" границу светотени вводят в поле зрения окуляра. Вращают маховичок компенсатора "К" до исчезновения окраски границы светотеней. Наблюдая в окуляр, маховичком "И" наводят границу светотени точно на линию штриха.

Снимают отсчет по шкале. Показатель преломления дистиллированной воды должен быть равен 1,333.

2. Измерение показателя преломления сыворотки крови проводят аналогичным образом.

3. После проведения измерений поверхности призм очищают мягкой салфеткой.

Расчет

Зная показатель преломления, расчет проводят по таблице.

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

Нормальные величины

Сыворотка крови	дети от 1 года до 3 лет	54-85 г/л
	старшие дети и взрослые	65-85 г/л

Клинико-диагностическое значение

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

Гиперпротеинемия

Истинное повышение концентрации белка в крови чаще всего связано с увеличением фракции глобулинов. Встречается при острых инфекциях (увеличение синтеза белков острой фазы), при хронических инфекциях (за счет γ -глобулинемии), при миеломной болезни, лимфогрануломатозе, саркоидозе.

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

Гипопротеинемия

Снижение концентрации белка в крови чаще всего связано с уменьшением фракции альбуминов крови.

Абсолютная (истинная) гипопротеинемия связана:

- с недостаточным потреблением белка с пищей – заболевания желудочно-кишечного тракта, сужение пищевода при опухолях, полное или частичное голодание;
- со снижением синтеза белка – несбалансированный аминокислотный состав пищи, хронические паренхиматозные гепатиты, интоксикации, злокачественные новообразования, лечение кортикостероидами;

- с усиленным распадом белков – кахексия, тяжелые инфекции, длительные воспалительные процессы, лихорадочные состояния, тиреотоксикозы;
- с потерей белка – нарушения проницаемости капиллярных стенок, кровоизлияния, ожоги, острые и хронические кровотечения, нефротический синдром.

Относительная гипопропротеинемия связана с нарушением водного баланса – гипергидратация при гиперальдостеронизме, при почечной недостаточности со снижением экскреции солей, при использовании для питья морской воды, при неадекватных инфузиях солевых растворов.

Оформление работы

Указывают принцип методов, ход работы, нормальные величины и результаты исследования биуретовым и рефрактометрическими методами, отмечают клинико-диагностическое значение показателя и делают выводы о возможной патологии.

Лабораторная работа 2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКА В МОЧЕ

Материал исследования

Нормальная моча и моча с белком.

Реактивы

1) Конц. HNO_3 , 2) 20% р-р сульфосалициловой кислоты.

Полуколичественное определение методом Робертса-Стольникова

Принцип

Метод основан на реакции Геллера, заключающейся в том, что на границе концентрированной азотной кислоты и мочи при наличии белка происходит его коагуляция и появляется мутное белое колечко, толщина и быстрота появления которого зависят от количества белка.

Проведение анализа

Не касаясь стенок, на дно пробирки наливают около 1,0 мл конц. HNO_3 , осторожно наслаивают из пипетки 1,0 мл мочи. Появление тонкого белого кольца на границе двух жидкостей между 2-й и 3-й минутами указывает на наличие белка в концентрации примерно 0,033 г/л (33 мг/л).

Если кольцо появляется раньше 2 минут после наслаивания, мочу следует развести водой и провести повторное наслаивание уже разведенной мочи. Степень разведения мочи подбирают в зависимости от вида кольца, т.е. его ширины, компактности и времени появления. При нитевидном колечке достаточно разведения в 2 раза, при более широком кольце необходимо разведение в 5, 10 и более раз.

Разведение	Количество жидкости, мл	
	вода	моча
1 : 2	0,50	0,50
1 : 5	0,80	0,20
1 : 10	0,90	0,10
1 : 15	1,87	0,13
1 : 20	1,90	0,10
1 : 50	1,96	0,04

Путем последовательного разведения мочи и ее наслаивания на азотную кислоту достигают такого максимального разведения мочи, при котором еще появляется едва заметное колечко между 2-й и 3-й минутами. Это соответствует 0,033 г/л или 33 мг/л белка.

Расчет

Концентрация белка, мг/сут = $33 \times A \times D$, где

где 33 – минимально определяемое количество белка (мг/л),

A – разведение мочи, D – суточный диурез (1,2-1,5 л).

Нормальные величины

Моча 50-150 мг/сут

Клинико-диагностическое значение

См. ниже.

Проба с сульфосалициловой кислотой

Принцип

При добавлении сульфосалициловой кислоты к моче рН мочи снижается до 1,0-2,0. При этом белки образуют с анионом сульфосалицилата нерастворимые комплексы.

Проведение анализа

К 2,0 мл мочи добавляют 2-4 капли сульфосалициловой кислоты. При наличии белка в моче выпадает белый осадок.

Нормальные величины

Моча отсутствие помутнения

Клинико-диагностическое значение

Небольшое количество белка в суточной моче присутствует и у вполне здоровых лиц, однако в разовой порции мочи такие концентрации обычными методами не выявляются. Часть этих белков сывороточного происхождения, другая часть является продуктом мочевыводящих путей.

Обнаружение в моче белков чаще всего свидетельствует о заболеваниях почек. Принято подразделять протеинурию в зависимости от места возникновения:

- преренальную, связанную с усиленным распадом белков тканей или выраженным гемолизом;
- ренальную, обусловленную патологией клубочков или канальцев почек;

- постренальную, связанную с воспалением мочевыводящих путей.

Оформление работы

Указывают принцип метода, ход работы, нормальные величины, отмечают клинико-диагностическое значение. Результаты работы записывают в виде таблицы. В выводах указывают состояния, при которых в моче обнаруживается белок.

Название метода	Материал исследования	Результаты
Проба Робертса-Стольникова	Нормальная моча	
	Моча с белком	
Проба с сульфосалициловой кислотой	Нормальная моча	
	Моча с белком	

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один правильный ответ.

- ПРАВИЛЬНО ХАРАКТЕРИЗУЕТ СВОЙСТВА БИОЛОГИЧЕСКОГО КОДА СЛЕДУЮЩЕЕ ПОЛОЖЕНИЕ
 - каждому кодону соответствует до трех аминокислот
 - одну аминокислоту могут кодировать несколько триплетов
 - каждой аминокислоте соответствует только один кодон
 - кодона м-РНК считываются в направлении от 3' к 5' концу
- ДЛЯ ПРОЦЕССА ТРАНСКРИПЦИИ МАТРИЦЕЙ ЯВЛЯЕТСЯ
 - ДНК
 - мРНК
 - тРНК
 - рРНК
- ДЛЯ РЕАКЦИЙ ТРАНСЛЯЦИИ НЕОБХОДИМО НАЛИЧИЕ
 - лизосом
 - РНК-полимеразы
 - м-РНК
 - АТФ
- ДЛЯ ОБРАЗОВАНИЯ ПЕПТИДНЫХ СВЯЗЕЙ В ПРОЦЕССЕ СИНТЕЗА БЕЛКА НЕОБХОДИМА
 - аминоацил-т-РНК синтетаза
 - пептидилтрансфераза
 - транслоказа

- 4) карбоксипептидаза
5. К ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫМ ИЗМЕНЕНИЯМ, КОТОРЫЕ МОГУТ ПРОИСХОДИТЬ С БЕЛКОВЫМИ МОЛЕКУЛАМИ, НЕ ОТНОСИТСЯ
- 1) частичный протеолиз
 - 2) полиаденилирование
 - 3) ковалентное присоединение простетической группы
 - 4) карбоксилирование
6. СИНТЕЗ БЕЛКА СТИМУЛИРУЕТ ГОРМОН
- 1) инсулин
 - 2) глюкагон
 - 3) адреналин
 - 4) вазопрессин
7. ПРИЧИНОЙ, КОТОРАЯ ОБУСЛОВЛИВАЕТ ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ РАЗЛИЧИЯ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ МНОГОКЛЕТОЧНОГО ОРГАНИЗМА, ЯВЛЯЕТСЯ
- 1) стойкая репрессия отдельных генов
 - 2) аллостерическое ингибирование различных ферментов
 - 3) различия в наборе ДНК
 - 4) различия в посттрансляционной модификации белков
8. СИНТЕЗ БЕЛКА НА СТАДИИ ИНИЦИАЦИИ ИНГИБИРУЕТ
- 1) пенициллин
 - 2) стрептомицин
 - 3) эритромицин
 - 4) хлорамфеникол
9. ПЕПТИДИЛТРАНСФЕРАЗНУЮ РЕАКЦИЮ ИНГИБИРУЕТ
- 1) хлорамфеникол
 - 2) ампициллин
 - 3) рифампицин
 - 4) эритромицин
10. ТРАНСЛОКАЗНУЮ РЕАКЦИЮ ИНГИБИРУЕТ
- 1) эритромицин
 - 2) тетрациклин
 - 3) ампициллин
 - 4) хлорамфеникол

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

1. В кодоне 5'-ГАА-3' информационной РНК, ответственной за синтез β -полипептидной цепи гемоглобина, обнаружено замещение последнего аденилового нуклеотида на уридиловый.

В результате чего имеется такая замена и к возникновению какого заболевания она приведет и почему?

2. Противоопухолевый препарат цисплатин является ингибитором ферментов топоизомераз.

Каким образом это ингибирование влияет на состояние опухолевых клеток?

3. Для транспорта жиров в крови присутствуют надмолекулярные структуры – липопротеины. Некоторые из липопротеинов содержат белки, называемые апоВ-48 и апоВ-100. Известно, что синтез обоих апоВ-белков кодирует один ген, но масса белков отличается примерно в 2 раза (апоВ-48 – 241 кДа, апоВ-100 – 512 кДа).

Предположите причину такого различия.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ К ИТОГОВОМУ ЗАНЯТИЮ

1. Баланс азота в организме. Понятие азотистого равновесия. Биологическая ценность белков. Заменяемые и незаменимые аминокислоты. Нормы потребления белка у детей и взрослых и пищевые источники белка. Что такое эталонный белок? Симптомы белковой недостаточности.
2. переваривание белков в желудочно-кишечном тракте. Реакции образования соляной кислоты, роль HCl. Регуляция секреции соляной кислоты. Ферменты ЖКТ, экзо- и эндопептидазы, их локализация, механизм активации ферментов, их оптимум pH, специфичность. Механизм всасывания аминокислот.
3. Особенности переваривания белков и всасывания аминокислот у детей разного возраста. Причины нарушения переваривания и всасывания у детей и связь этих нарушений с развитием аллергических состояний. Что такое целиакия, укажите причины и клинические проявления заболевания.
4. Процесс гниения белков в кишечнике. Его причины и последствия. Вещества, образующиеся в этом процессе. Системы обезвреживания токсичных продуктов в печени: микросомальное окисление, реакции конъюгации, укажите строение и роль ФАФС и УДФГК. Реакции образования животного индикана.
5. Качественные реакции на соляную кислоту в желудочном соке. Определение общей кислотности, свободной и связанной соляной кислоты желудочного сока. Принцип метода, ход определения, нормальные показатели и клинико-диагностическое значение.
6. Обнаружение молочной кислоты в желудочном соке. Принцип метода, ход определения, нормальные показатели и клинико-диагностическое значение.
7. Обнаружение крови и гемоглобина в желудочном соке. Принцип метода, ход определения, нормальные показатели и клинико-диагностическое значение.
8. Беззондовый метод определения кислотности желудочного сока (ацидотест), принцип метода.
9. Источники и пути превращений аминокислот в тканях. По какому признаку аминокислоты делятся на глюкогенные и кетогенные? Использование аминокислот в медицинской практике.
10. Четыре вида реакций дезаминирования аминокислот. Особенности окислительного дезаминирования. Характеристика трансдезаминирования – механизм реакций, ферменты, коферменты, локализация процесса. Значение реакций трансаминирования. Роль цикла ИМФ-АМФ, его реакции.

11. Характеристика аспартатаминотрансферазы (АсАТ) и аланинаминотрансферазы (АлАТ), катализируемые реакции. Метод количественного определения активности аминотрансфераз АсАТ и АлАТ в сыворотке крови. Укажите клинико-диагностическое значение определения их активности в крови, нормальные показатели.
12. Глутаматдегидрогеназа: локализация, строение, роль, регуляция активности. Судьба азота и α -кетокислот, образовавшихся в процессах дезаминирования.
13. Значение декарбоксилирования аминокислот. Роль биогенных аминов – гистамин, серотонин, γ -аминомасляная кислота, дофамин. Реакции синтеза биогенных аминов – химизм, ферменты, коферменты, продукты, локализация процесса. Реакции инактивации биогенных аминов.
14. Пути образования и связывания аммиака в тканях (схема). Роль печени, почек и кишечника в выведении аммиака. Каков допустимый уровень концентрации аммиака в крови? Основные причины токсичности аммиака. Гипераммониемии, укажите их причины и последствия. Глюкозо-аланиновый цикл, значение, реакции.
15. Синтез мочевины, реакции, локализация, значение. Нарушения синтеза мочевины. Количественное определение мочевины в сыворотке крови и моче. Принцип метода, ход определения, нормальные показатели и клинико-диагностическое значение.
16. Аммонийогенез, реакции, их локализация, значение.
17. Синтез креатина и креатинфосфата, реакции. Биологическая роль креатинфосфата. Физиологическая креатинурия детей.
18. Синтез креатинина, реакция, локализация. Определение концентрации креатинина в сыворотке крови и моче. Принцип метода, ход определения, нормальные показатели и клинико-диагностическое значение.
19. Пути метаболизма глутаминовой и аспарагиновой кислот (схема). Реакции, в которых они принимают участие. Связь обмена аминокислот с циклом трикарбоновых кислот.
20. Пути использования цистеина и его серы (схема). Реакции синтеза таурина. Причина и последствия нарушений при цистинозе и цистинурии.
21. Пути использования серина и глицина (схема). Реакции взаимопревращения глицина и серина, реакция катаболизма глицина. Роль тетрагидрофолиевой кислоты.
22. Реакции, отражающие взаимосвязь обмена глицина, серина, метионина и цистеина. Участие фолиевой кислоты и витамина В₁₂. Роль аденозилметионина в процессах

- трансметилирования. Гомоцистеинемия и гомоцистинурия, их причины и последствия.
23. Реакции синтеза веществ с участием ТГФК (dТМФ, серин, метионин). Механизм антибактериальной активности сульфаниламидных препаратов.
 24. Метаболизм фенилаланина и тирозина. Пути использования тирозина (схема). Реакции синтеза тирозина из фенилаланина и его катаболизма.
 25. Фенилкетонурия I и II типов: причина, клинические проявления, основы лечения.
 26. Тирозинемии I, II и III типов, алкаптонурия, паркинсонизм, альбинизм: причины, характерные особенности заболеваний, основы лечения.
 27. Строение нуклеопротеинов: белки, нуклеиновые кислоты. Структурные формулы азотистых оснований, нуклеозидов, нуклеотидов. Ферменты переваривания нуклеопротеинов в ЖКТ. Дальнейшая судьба пуринов и пиримидинов.
 28. Строение пурина, источники атомов азота и углерода пуринового кольца. Первые две реакции синтеза пуриновых нуклеотидов, реакции синтеза АМФ и ГМФ, превращения АМФ в АТФ, ГМФ в ГТФ. Регуляция синтеза пуриновых нуклеотидов.
 29. Реакции катаболизма пуриновых нуклеотидов до мочевой кислоты. Реутилизация гуанина и гипоксантина.
 30. Нарушения катаболизма пуринов:
 - гиперурикемия, ее причины, типы и последствия, основы лечения;
 - мочекаменная болезнь, ее причины, типы и последствия, основы лечения;
 - подагра, ее причины, типы и последствия, основы лечения;
 - синдром Леша-Нихана, его причины, типы и последствия, основы лечения.
 31. Синтез пиримидиновых нуклеотидов УТФ и ЦТФ, реакции, локализация, регуляция. Оротатацидурия.
 32. Синтез дезоксирибонуклеотидов. Роль тиоредоксина и НАДФН. Реакции синтеза dТМФ, участие метилен-ТГФК.
 33. Реакции распада пиримидиновых нуклеотидов до углекислого газа, аммиака и воды.
 34. Лекарственные препараты – ингибиторы синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Механизм их действия.
 35. Особенности строения и отличия первичной и вторичной структур РНК и ДНК. Типы РНК, их локализация, функции. Роль гистонов в формировании третичной структуры ДНК (суперспирализация).

36. Репликация ДНК эукариот. Суммарное уравнение, ферменты ДНК-синтезирующей системы, основные этапы и особенности репликации ДНК. Связь с фазами клеточного цикла. Репарация ДНК.
37. Транскрипция РНК, ферменты и компоненты РНК-синтезирующей системы. Понятие экзонов и интронов. Процессы созревания тРНК, рРНК и мРНК. Регуляция транскрипции у прокариот путем индукции и репрессии. Способы регуляции транскрипции у эукариот.
38. Этапы трансляции, компоненты белок-синтезирующей системы, ферменты, регуляция процессов. Что такое генетический код? Свойства генетического кода. Адапторная роль транспортной РНК. Реакция синтеза аминоксил-тРНК.
39. Посттрансляционная модификация белков, примеры. Что такое фолдинг? Роль шаперонов.
40. Лекарственные препараты – ингибиторы биосинтеза РНК, ДНК, белка. Механизм их действия.
41. Принцип и ход определения количества белка в сыворотке крови биуретовым и рефрактометрическим методами. Нормальные показатели и клинико-диагностическое значение.
42. Обнаружение белка в моче пробой с сульфосалициловой кислотой и методом Робертса-Стольникова. Принцип методов и ход определения. Укажите нормальные показатели и клинико-диагностическое значение.
43. Виды хроматографии, их принцип. С какой целью используют хроматографию? Проведение распределительной хроматографии аминокислот на бумаге. Что такое диализ?
44. Проведение качественной реакции на мочевую кислоту. Принцип метода и ход определения.
45. Колориметрический и титрометрический методы определения концентрации мочевой кислоты в сыворотке крови и моче. Принцип методов, ход определения, нормальные показатели и клинико-диагностическое значение.
46. Анализ химического состава нуклеопротеинов. Принцип метода и ход определения.

РАЗДЕЛ 8

СТРОЕНИЕ И ОБМЕН УГЛЕВОДОВ

ТЕМА 8.1. СТРОЕНИЕ И ВНЕШНИЙ ОБМЕН УГЛЕВОДОВ. ОБМЕН ГЛИКОГЕНА

АКТУАЛЬНОСТЬ

В организме человека и животных углеводы играют важную роль и выполняют разнообразные функции: 1) служат источником энергии, обеспечивая до 67% суточного энергопотребления организма; 2) являются пластическим материалом клеток; 3) используются в качестве исходных продуктов для синтеза липидов, белков и нуклеиновых кислот; 4) углеводные компоненты входят в состав иммуноглобулинов и т.д. К заболеваниям, связанным с патологией углеводного обмена, относятся сахарный диабет, гликогенозы, мукополисахаридозы, галактоземии, фруктоземии, интолерантность к лактозе и сахарозе.

ЦЕЛЬ

Изучение переваривания углеводов в пищеварительном тракте. Изучение обмена гликогена – энергетического резерва организма.

Ознакомление на практике с особенностями переваривания целлюлозы и крахмала в желудочно-кишечном тракте. Приобретение практических навыков по проведению качественного анализа мочи на присутствие глюкозы при помощи цветных реакций.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Биологическая роль углеводов. Суточная потребность в углеводах у взрослых и детей. Пищевые продукты – источники углеводов.
2. Классификация углеводов в зависимости от количества мономеров в молекуле (моно-, ди-, олиго- и полисахариды), в зависимости от числа углеродных атомов (триозы, тетрозы, пентозы, гексозы) и по положению карбонильной группы (альдозы и кетозы).
3. Структура и функции представителей углеводов:
 - моносахаридов (глюкоза, фруктоза, галактоза, рибоза, дезоксирибоза, глицеральдегид, диоксиацетон),
 - дисахаридов (мальтоза, лактоза, сахароза, целлобиоза),
 - полисахаридов (крахмал, гликоген, целлюлоза).
4. Производные моносахаридов. Что такое сиаловые кислоты? Химическая формула N-ацетилнейраминовой кислоты.
5. Сложные углеводы – гликозаминогликаны. Строение гиалуроновой и хондроитинсерной кислот, их биологическая роль. Строение и роль гликопротеинов.

6. Переваривание углеводов в ротовой полости и кишечнике. Характеристика ферментов переваривания: α -амилаза ротовой полости, ферменты панкреатического сока (α -амилаза, олиго-1,6-глюкозидаза), ферментные комплексы тонкого кишечника, отвечающие за гидролиз дисахаридов (сахаразо-изомальтазный, гликоамилазный, β -глюкозидазный).
7. Возрастные особенности переваривания и всасывания углеводов. Биохимические причины непереносимости сахарозы и лактозы у детей.
8. Причины непережевывания целлюлозы в желудочно-кишечном тракте человека. Роль целлюлозы в пищеварении человека.
9. Транспорт моносахаридов через клеточные мембраны.
10. Пути превращения глюкозы в клетке. Источники глюкозы в клетке. Фосфорилирование глюкозы, роль реакции.
11. Превращение фруктозы в глюкозу. Пути метаболизма фруктозы. Каково значение фруктозы в обмене веществ плода и новорожденных? Эссенциальная фруктозурия.
12. Роль галактозы в организме. Превращение галактозы в глюкозу. Галактоземия, молекулярные причины, клинические проявления и основы лечения.
13. Синтез гликогена из глюкозо-6-фосфата (гликогеногенез). Распад гликогена до глюкозо-6-фосфата (гликогенолиз). Особенности обмена гликогена в печени и мышцах при некоторых физиологических состояниях (потребление пищи, голодание, мышечная активность).
14. Регуляция ферментов обмена гликогена – гликогенсинтазы и гликогенфосфорилазы.
 - гормональная – влияние адреналина и глюкагона (аденилатциклазный механизм, роль цАМФ и протеинкиназы А); роль инсулина и участие фосфодиэстеразы в снижении концентрации цАМФ в клетке.
 - аллостерическая регуляция активности гликогенфосфорилазы при участии АМФ;
 - кальций-зависимая активация киназы фосфорилазы гликогена.
15. Генетические нарушения распада гликогена: печеночные, мышечные и смешанные гликогенозы. Что такое агликогеноз?
16. Особенности обмена углеводов в печени. Участие глюкокиназы и глюкозо-6-фосфатазы в обеспечении роли печени по поддержанию постоянной концентрации глюкозы в крови.
17. Углеводы – лекарственные препараты (глюкоза, гиалуроновая кислота, хондроитинсульфат, декстраны, гепарин, сердечные гликозиды).
18. Качественные реакции на глюкозу (реакции Троммера и Фелинга). Принцип методов.

19. Практическое исследование переваривания углеводов в желудочно-кишечном тракте, принцип метода.

ТЕМЫ ДЛЯ РЕФЕРАТИВНЫХ СООБЩЕНИЙ

1. Сиаловые кислоты. Гликозаминогликаны (гиалуроновая кислота, хондроитинсульфат, дерматансульфат, кератансульфат, гепарин). Их характеристика: строение, биологическая роль. Использование в медицине.
2. Фруктоза: ее значение в обмене плода и новорожденных. Химизм процессов обмена фруктозы. Нарушения обмена фруктозы: эссенциальная фруктоземия, наследственная непереносимость фруктозы.

Лабораторная работа 1

ОБНАРУЖЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ В МОЧЕ

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

Реактивы

1) 1% р-р глюкозы, 2) 1% р-р CuSO_4 ; 3) 10% р-р NaOH ; 4) реактив Фелинг I, содержащий NaOH , 5) реактив Фелинг II, содержащий раствор CuSO_4 .

Материал исследования

Моча нормальная и моча с глюкозой.

Реакция Троммера

Принцип

Реакция основана на способности глюкозы восстанавливать при нагревании в щелочной среде гидроксид меди (II) $\text{Cu}(\text{OH})_2$ голубого цвета в гидроксид меди (I) CuOH желтого цвета и закись меди Cu_2O красного цвета.

Проведение анализа

	Контроль, капли	Опыт 1, капли	Опыт 2, капли
1% раствор глюкозы	5	—	—
Нормальная моча	—	5	—
Моча с глюкозой	—	—	5
10% р-р NaOH	15	15	15
1% р-р CuSO_4	5	5	5
	Пробы одновременно нагревают в кипящей водяной бане до появления окраски как минимум в одной из проб		

Нормальные значения

Моча

отсутствие

Реакция Феллинга

Принцип

Реакция Феллинга основана на том же принципе, что и реакция Троммера. Отличие и преимущество этой реакции заключа-

ются в том, что Фелинг для стабилизации катионов Cu^{2+} предложил прибавлять сегнетовую соль, которая препятствует выпадению черного осадка CuO при нагревании, искажающего полученные результаты.

Проведение анализа

Проводят соответственно таблице:

	Контроль, капли	Опыт 1, капли	Опыт 2, капли
Раствор глюкозы	5	—	—
Нормальная моча	—	5	—
Моча с глюкозой	—	—	5
Раствор Фелинг I	2	2	2
Раствор Фелинг II	2	2	2
	Пробы одновременно нагревают в кипящей водяной бане до появления окраски как минимум в одной из проб		

Нормальные значения

Моча отсутствие

Клинико-диагностическое значение

Глюкозурии могут быть физиологическими и патологическими. К *физиологическим* относятся алиментарная глюкозурия, глюкозурия беременных и нейрогенная глюкозурия стрессовых состояний.

Патологическая глюкозурия возникает чаще всего в результате выраженной гипергликемии при патологических изменениях в поджелудочной железе (острый панкреатит, сахарный диабет), надпочечниках ("бронзовый" или стероидный диабет), также при тиреотоксикозе, акромегалии, инфаркте миокарда, кровоизлияниях во внутренние органы, отравлениях морфином, фосфором, при острых инфекциях.

Поражение почечных канальцев и отсутствие реабсорбции глюкозы также приводят к глюкозурии.

Оформление работы

Работу записывают в виде таблицы. По результатам анализа делается вывод о способности данных методов выявлять глюкозу в жидкости.

Исследуемый материал	Реакция	Результат
Нормальная моча		
Моча с глюкозой		

Лабораторная работа 2

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ АМИЛАЗЫ СЛЮНЫ НА КРАХМАЛ И ЦЕЛЛЮЛОЗУ

Крахмал является гомополисахаридом, состоящим из амилопектина и α -амилозы. В α -амилозе остатки глюкозы связаны

между собой α -(1→4)-гликозидными связями, в амилопектине – α -(1→4)-гликозидными связями и α -(1→6)-гликозидными связями. Целлюлоза является гомополисахаридом, в котором остатки глюкозы связаны между собой только β -(1→4)-гликозидными связями.

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

Принцип

В пробу вносят биологическую жидкость (источник ферментов) и предполагаемый субстрат (крахмал и целлюлоза). О протекании гидролиза субстрата можно судить по появлению характерной окраски при проведении реакции Троммера (см. "Лабораторная работа 1").

Положительная реакция Троммера свидетельствует о наличии в среде продуктов гидролиза – мальтозы или глюкозы. Отрицательная реакция свидетельствует об отсутствии продуктов гидролиза и неоптимальных условиях для работы фермента.

Материал исследования

1) 1% р-р крахмала, 2) 1% водная суспензия целлюлозы.

Реактивы

1) Желудочный сок; 2) 5% р-р панкреатина; 3) слюна, разведение (1:5); 4) 1% р-р CuSO_4 ; 5) 10% р-р NaOH .

Проведение анализа

1. Готовят пробы соответственно таблице:

№ пробы	Раствор крахмала, мл	Суспензия целлюлозы, мл	Слюна (1:5), 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

2. Для протекания реакции пробирки выдерживают при 37°C в течение 30 минут.

3. После инкубации содержимое каждой пробирки анализируют на присутствие продуктов расщепления полисахарида с помощью реакции Троммера.

4. Для этого в каждую из 8 пробирок добавляют по 15 капель 10% раствора NaOH и по 5 капель 1% раствора CuSO_4 . Ставят все пробирки в кипящую водяную баню и кипятят в течение 1 ми-

нуты. Появление красного осадка оксида меди (I) указывает на положительную реакцию Троммера в присутствии мальтозы.

Примечание: возможная окраска пробирок 4 и 8 в розово-фиолетовый цвет обусловлена биуретовой реакцией на белки препарата панкреатина. Желтый цвет в пробе 8 может быть вызван наличием глюкозы в ткани поджелудочной железы, из которой приготовлен панкреатин.

Оформление работы

Указывают принцип метода и ход работы. Результаты оформляют в виде таблицы. Делают вывод об особенностях переваривания крахмала и целлюлозы в пищеварительном тракте.

№ пробы	Субстрат	Ферменты, присутствующие в пробе	Условия работы фермента (рН)	Результаты

ТЕМА 8.2. ОКИСЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ В АНАЭРОБНЫХ УСЛОВИЯХ. ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗ

АКТУАЛЬНОСТЬ

Гликолиз – центральный путь катаболизма глюкозы. В анаэробных условиях гликолиз – единственный процесс в организме, поставляющий энергию. Именно благодаря гликолизу организм может существовать в условиях гипоксии. В эритроцитах анаэробное превращение углеводов является единственным процессом, продуцирующим АТФ и поддерживающим их целостность и функции. В аэробных условиях гликолиз представляет собой начальную стадию расщепления глюкозы, завершающуюся аэробным окислением образовавшихся промежуточных продуктов.

Поддержание стабильного уровня глюкозы при физической работе или голодании обеспечивается реакциями глюконеогенеза. Это вносит вклад в снижение ацидоза при данных состояниях и обеспечивает глюкозой нервную ткань и эритроциты.

ЦЕЛЬ

Изучение процессов гликолиза, спиртового брожения, глюконеогенеза, регуляции процессов распада и синтеза глюкозы.

Приобретение практических навыков по проведению количественного определения глюкозы в моче и сыворотке крови, молочной кислоты в гомогенате мышечной ткани.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Источники и пути превращения глюкозы в клетке. Роль глюкозо-6-фосфата в метаболизме глюкозы.

2. Характеристика процесса гликолиза (молочно-кислое брожение) по плану:
- локализация и условия протекания процесса,
 - последовательность реакций и ферменты,
 - конечные продукты,
 - участие адениловых нуклеотидов и энергетический эффект,
 - необратимые реакции гликолиза,
 - реакции гликолиза, сопряженные с потреблением АТФ,
 - реакции субстратного фосфорилирования, их сущность и значение,
 - гликолитическая оксидоредукция НАД⁺ и НАДН, ее сущность и значение.
3. Характеристика процесса глюконеогенеза по плану:
- локализация и условия протекания реакций,
 - субстраты (молочная кислота, глицерол, аминокислоты). Откуда поступают эти вещества?
 - последовательность реакций и ферменты,
 - реакции глюконеогенеза, сопряженные с потреблением ГТФ и АТФ,
 - необратимые реакции глюконеогенеза,
 - значение при голодании и физической работе,
 - расход энергии для синтеза одной молекулы глюкозы.
4. Роль гликолиза и глюконеогенеза в метаболизме плода и новорожденных.
5. Гормональная регуляция гликолиза и глюконеогенеза. Роль инсулина, адреналина, кортизола, глюкагона. Ферменты, регулируемые этими гормонами.
6. Аллостерическая регуляция гликолиза и глюконеогенеза, роль АТФ, АДФ, АМФ, цитрата, жирных кислот, глюкозо-6-фосфата, фруктозо-6-фосфата, фруктозо-1,6-дифосфата, ацетил-SКоА. Регулируемые ферменты.
7. Глюкозо-лактатный цикл (цикл Кори), его значение при физической работе. Источники молочной кислоты в организме.
8. Глюкозо-аланиновый цикл, его значение при физической работе и голодании.
9. Энергетический эффект окисления глюкозы в анаэробных условиях. Сравнение энергетического эффекта анаэробного окисления глюкозы и распада гликогена до лактата.
10. Спиртовое брожение: локализация процесса, специфические реакции, условия протекания реакций, последовательность реакций, энергетический эффект, конечные продукты. Сходство и отличие спиртового брожения и гликолиза.
11. Метаболизм этилового спирта в печени при участии алкогольдегидрогеназы и ацетальдегиддегидрогеназы, последова-

тельность реакций, конечные продукты. Энергетический эффект окисления одной молекулы этанола.

12. Влияние этилового алкоголя на обмен углеводов в организме человека. Каковы причины гиперлактатемии и гипогликемии при алкогольной интоксикации?
13. Синтез глюкозы из аланина, аспартата и глутамата. При каких условиях и где протекают реакции? В чем их значение?
14. Глюкозооксидазный метод определения содержания глюкозы в сыворотке крови и моче. Принцип метода. Нормальные показатели. Клинико-диагностическое значение.
15. Полуколичественный метод Альтгаузена определения содержания глюкозы в моче. Принцип метода. Нормальные показатели. Клинико-диагностическое значение.
16. Как обнаружить молочную кислоту в мышечной ткани с помощью реакции Уффельмана?

ТЕМЫ ДЛЯ РЕФЕРАТИВНЫХ СООБЩЕНИЙ

1. Молекулярный механизм развития алкогольной интоксикации. Причины повышенной чувствительности детей к алкоголю. Хронический алкоголизм. Клинико-лабораторная диагностика.
2. Алкогольдегидрогеназа, катализируемые реакции, субстраты. Участие в биохимических и физиологических процессах. Изоферменты.
3. Глюконеогенез и его значение в метаболизме плода и новорожденного. Гипогликемия новорожденных, критерии, причины возникновения.

Лабораторная работа 1

ГЛЮКОЗООКСИДАЗНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ГЛЮКОЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И МОЧЕ

Принцип

Глюкоза с помощью глюкозооксидазы окисляется до глюконовой кислоты с образованием пероксида водорода. Пероксид водорода в присутствии хлорфенола при участии фермента пероксидазы окисляет краситель 4-аминоантипирин, превращая его в хинонимин, окрашенный продукт розово-малинового цвета. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию глюкозы и определяется фотоколориметрически.

Материал исследования

Сыворотка крови. Моча.

Реактивы

1) Рабочий реагент, содержащий фенол, глюкозооксидазу, пероксидазу, 4-аминоантипирин в калиево-фосфатном буфере.

Стандартный раствор глюкозы, 5,5 ммоль/л.

Проведение анализа

	Опыт 1, мл	Опыт 2, мл	Стандарт, мл
Сыворотка крови	0,02	—	—
Моча	—	0,02	—
Стандартный раствор глюкозы	—	—	0,02
Рабочий реагент	2,0	2,0	2,0
	Инкубируют в течение 25 минут при 37°С. Измеряют оптическую плотность против воды при длине волны 540 нм (зеленый светофильтр)		

Расчет

$$\text{Концентрация глюкозы, ммоль/л} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}}, \text{ где}$$

$E_{\text{оп}}$ и $E_{\text{ст}}$ – оптическая плотность опытных и стандартной проб,
 $C_{\text{ст}}$ – концентрация стандартного раствора

Нормальные величины

Сыворотка крови взрослые 3,3-5,8 ммоль/л
Моча 0,06-0,83 ммоль/л

Клинико-диагностическое значение

Сыворотка крови

Увеличение содержания глюкозы в крови наблюдается как при физиологических, так и при патологических состояниях.

Физиологические гипергликемии

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

Патологические гипергликемии

Патологические гипергликемии, как правило, обусловлены нейроэндокринными расстройствами:

- сахарный диабет, связанный с абсолютной или относительной инсулиновой недостаточностью,
- заболевания гипофиза, сопровождающиеся повышенной секрецией в кровь соматотропина и кортикотропина (акромегалия, болезнь Иценко-Кушинга, опухоли гипофиза и др.),
- опухоли мозгового слоя надпочечников, когда усилено образование катехоламинов (феохромоцитома),

- опухоли коркового слоя надпочечников с усиленной продукцией глюкокортикоидов,
- гиперфункция щитовидной железы, некоторые болезни печени (инфекционный гепатит, цирроз печени).

Снижение концентрации глюкозы в крови также может быть физиологическое и патологическое.

Физиологические гипогликемии

К физиологической гипогликемии относят избыточную секрецию в кровь инсулина в ответ на алиментарную гипергликемию; гипогликемию после тяжелой и длительной мышечной работы, при полном или частичном голодании. Гипогликемия может возникать у женщин в период лактации в результате усиленного поглощения глюкозы молочной железой. У новорожденных часто наблюдается гипогликемия, обусловленная резким прекращением поступления "материнской" глюкозы, незрелостью структуры печени и повышенной чувствительностью клеток к инсулину.

Патологические гипогликемии

Наблюдаются при гиперинсулинизме при гиперплазии β -клеток островков Лангерганса (инсулинома, аденома и рак поджелудочной железы). Самая распространенная причина гипогликемий – передозировка инсулина. Кроме того гипогликемию вызывает недостаток гормона кортизола при гипофункции коры надпочечников (Аддисонова болезнь, опухоли надпочечников), гипофункции передней доли гипофиза (болезнь Симмондса), гипофункции щитовидной железы. Гипогликемия может возникать при токсических поражениях печени, гликогенозах, при заболеваниях почек вследствие глюкозурии.

Моча

См. ниже.

Оформление работы

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

Лабораторная работа 2

ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ГЛЮКОЗЫ В МОЧЕ ПО АЛЬТГАУЗЕНУ

Реактивы

1) 0,5%, 1%, 2%, 3% р-ры глюкозы, 2) 10% р-р NaOH.

Принцип

Глюкоза при кипячении в щелочной среде превращается в окрашенные продукты окисления (от желтого до темно-коричневого цвета). Интенсивность окраски прямо пропорциональна содержанию глюкозы.

Материал исследования

Моча нормальная и моча с глюкозой.

Проведение анализа

	Контроль, мл	Опыт 1, мл	Опыт 2, мл
Дистил. вода	4,0	—	—
Моча нормальная	—	4,0	—
Моча с глюкозой	—	—	4,0
10% р-р NaOH	1,0	1,0	1,0
	Помещают в кипящую водяную баню одновременно с калибровочными пробами (см. ниже) и прогревают до появления желтого или бурого окрашивания		

Получение калибровочных проб

	Проба 1, мл	Проба 2, мл	Проба 3, мл	Проба 4, мл
0,5% р-р глюкозы	4,0	—	—	—
1% р-р глюкозы	—	4,0	—	—
2% р-р глюкозы	—	—	4,0	—
3% р-р глюкозы	—	—	—	4,0
10% р-р NaOH	1,0	1,0	1,0	1,0
	Прогревают все пробы (одновременно с опытными пробами) на кипящей водяной бане до появления интенсивного бурого окрашивания в пробе 4			

Сравнивают окраску опытных пробирок и окраску калибровочных пробирок. Визуально определяют содержание глюкозы в моче (в %) по наиболее совпадающему цвету растворов.

Нормальные величины

Моча до 0,5%

Клинико-диагностическое значение

Моча

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

Однако чаще глюкозурия сопровождается гипергликемией, когда содержание глюкозы в крови превышает величину почечного порога (9,0-10,0 ммоль/л).

Глюкозурии могут быть физиологическими и патологическими.

Физиологические глюкозурии

К физиологическим относятся алиментарная глюкозурия, глюкозурия беременных и нейрогенная глюкозурия стрессовых состояний.

Патологические глюкозурии

Возникают чаще всего в результате нарушений обмена углеводов при патологических изменениях в поджелудочной железе (острый панкреатит, сахарный диабет), надпочечниках ("бронзовый" или стероидный диабет), также при тиреотоксикозе, акромегалии, инфаркте миокарда, кровоизлияниях во внутренние органы, отравлениях морфином, фосфором, при острых инфекциях и нервных заболеваниях.

Оформление работы

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

Лабораторная работа 3

ОБНАРУЖЕНИЕ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ В МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ С ПОМОЩЬЮ РЕАКЦИИ УФФЕЛЬМАНА

Принцип

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

Материал исследования

Мышечная ткань.

Реактивы

1) Фосфатный буфер, pH 7,2; 2) 1% р-р фенола; 3) 1% р-р FeCl₃.

Проведение анализа

1. Приготовление экстракта мышечной ткани.

Кусочек мышечной ткани тщательно растирают в ступке с 5,0 мл фосфатного буферного раствора, перемешивают. Полученную мышечную кашу фильтруют через 2 слоя марли или центрифугируют при 1500 об/мин.

2. Цветная реакция на молочную кислоту.

В пробирке к 10 каплям 1% раствора фенола добавляют 1% раствор FeCl₃ до появления фиолетовой окраски. Затем к содержимому пробирки добавляют 3 капли экстракта мышц и наблю-

дают за изменением окраски. В присутствии молочной кислоты фиолетовая окраска раствора переходит в желто-зеленую вследствие образования лактата железа.

Практическое значение

Молочная кислота является конечным продуктом катаболизма глюкозы в анаэробных условиях, небольшое количество лактата в мышце образуется и при аэробных условиях. Нарботка лактата активируется при мышечной нагрузке как физиологического (физическая работа), так и патологического характера (нарушение кровообращения и гипоксия мышцы, приступ эпилепсии, столбняк, тетания).

При гипоксических состояниях, связанных с сердечной и легочной недостаточностью, при анемиях и нарушениях реологии крови производство молочной кислоты активируется в большинстве тканей.

Оформление работы

Указывают принцип метода, ход работы и результаты исследования, отмечают практическое значение показателя и делают выводы о возможной патологии.

ТЕМА 8.3. АЭРОБНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ. ПЕНТОЗОФОСФАТНЫЙ ПУТЬ

АКТУАЛЬНОСТЬ

Аэробный распад глюкозы – основной путь ее катаболизма у аэробных организмов. При аэробном распаде глюкозы выделяется гораздо больше энергии, чем при анаэробном гликолизе. Промежуточные продукты окислительного катаболизма глюкозы используются также в качестве предшественников при биосинтезе аминокислот, липидов и других биомолекул. В наибольшей зависимости от аэробного распада глюкозы находится мозг. Он расходует около 120 г глюкозы в сутки.

Пентозофосфатный путь выполняет анаболическую функцию. Он обеспечивает клетку молекулами НАДФН для восстановительных синтезов и пентозами для синтеза нуклеотидов.

ЦЕЛЬ

Изучение реакций аэробного распада глюкозы до углекислого газа и воды и реакций пентозофосфатного пути. Изучение нервной и гормональной регуляции обмена глюкозы. Изучение нарушений обмена углеводов.

Приобретение практических навыков по проведению теста толерантности к глюкозе и построению гликемических кривых.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Источники глюкозы крови. Нормальная концентрация глюкозы в крови. Возможные причины гипо- и гипергликемий.
2. Специфические и общие пути катаболизма глюкозы. Суммарное уравнение аэробного распада глюкозы.
3. Этапы аэробного распада глюкозы: 1 – окисление глюкозы до пирувата; 2 – окислительное декарбоксилирование пирувата; 3 – цикл трикарбоновых кислот, 4 – цепь переноса электронов и образование эндогенной воды.
4. Суммарное уравнение окислительного декарбоксилирования пировиноградной кислоты и его отдельные реакции. Компоненты мультиферментного пируватдегидрогеназного комплекса, ферменты и коферменты. Регуляция процесса. Какие витамины принимают участие в работе ПВК-дегидрогеназы? Их характеристика. Какие еще ферментативные комплексы обладают подобным строением?
5. Цикл трикарбоновых кислот, ферменты и коферменты, биологическая роль цикла. Регуляция процесса.
6. Глицеролфосфатная и малат-аспартатная челночные системы. Каково их значение?
7. Преимущества аэробного окисления глюкозы. Эффект Пастера, его биохимический механизм.
8. Характеристика пентозофосфатного пути окисления глюкозы по плану:
 - распространение и роль пентозофосфатного пути,
 - реакции окислительного этапа,
 - представление о неокислительном этапе (схематично),
 - ферменты, коферменты, витамины,
 - взаимосвязь процесса с гликолизом,
 - значение пентозофосфатного пути, например. в жировой клетке, эритроците, в делящихся клетках.
9. Образование АТФ при аэробном и анаэробном распадах глюкозы. Роль анаэробного и аэробного распадов глюкозы при мышечной работе. Как проявляется зависимость метаболизма нервной ткани от аэробного распада глюкозы?
10. Особенности окисления глюкозы в эритроците. Роль гликолиза, пентозофосфатного шунта, 2,3-дифосфоглицератного шунта.
11. Наследственная энзимопатия глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Факторы, провоцирующие проявление недостаточности фермента. Последствия.
12. Нервная регуляция обмена углеводов. Роль симпатической и парасимпатической систем.
13. Гормональная регуляция обмена углеводов. Влияние инсулина, адреналина, глюкагона, кортизола на уровень глюкозы

крови и на внутриклеточные процессы превращения глюкозы. Гормоночувствительные ферменты обмена углеводов.

14. Характеристика сахарного диабета I и II типов. Какие пути обмена углеводов нарушены? Биохимия осложнений сахарного диабета.

15. Тест толерантности к глюкозе. Диагностическое значение параметров гликемической кривой – крутизна подъема, величина подъема, время возвращения к исходным значениям. При каких заболеваниях изменяется вид гликемической кривой? Коэффициент Бодуэна и коэффициент Рафальского, их значение.

ТЕМЫ ДЛЯ РЕФЕРАТИВНЫХ СООБЩЕНИЙ

1. Функции НАДФН в метаболизме. Реакции, сопровождающиеся образованием НАДФН. Реакции синтеза веществ с его участием.

2. Молекулярные механизмы развития сахарного диабета I и II типов. Биохимические механизмы быстрых и отсроченных осложнений сахарного диабета.

Лабораторная работа 1

ТЕСТ ТОЛЕРАНТНОСТИ К ГЛЮКОЗЕ

Тест толерантности к глюкозе (проба с сахарной нагрузкой) является информативным тестом для выявления сахарного диабета на ранних этапах, нарушений гликогенообразовательной функции печени и оценки состояния тонкого кишечника.

Принцип

Тест толерантности к глюкозе основан на определении концентрации глюкозы в крови через определенные промежутки времени после приема глюкозы внутрь.

Концентрация глюкозы в крови определяется глюкозооксидазным методом (см Тема 8.2.).

Проведение теста толерантности к глюкозе

В клиничко-диагностических лабораториях исследуют пробы капиллярной крови, взятой натощак и через определенные промежутки времени после нагрузки глюкозой. Тест проводят следующим образом:

У обследуемого натощак берут кровь из пальца, затем дают глюкозу с теплой водой или слабым чаем. Детям в возрасте от 1,5 до 3 лет рекомендуется давать глюкозу из расчета 2,0 г на 1 кг массы тела, от 3 до 12 лет – 1,75 г/кг, после 12 лет – 1,25 г/кг. Взрослые принимают глюкозу в количестве 1,0-1,5 г/кг. Через 30, 60, 90 и 120 минут после приема глюкозы повторно берутся пробы крови. Далее определяют концентрацию глюкозы в пробах.

На **практическом занятии** метод сахарной нагрузки проводится с модельными образцами сыворотки крови, взятыми до глюкозной нагрузки, через 30, 60 и 120 минут после нагрузки. Во

всех взятых пробах определяют концентрацию глюкозы глюкозо-оксидазным методом (см. Тема 8.2.).

Материал исследования

Три набора модельных образцов сыворотки крови, содержащие нормальные, сниженные и повышенные концентрации глюкозы.

Реактивы

Рабочий реагент, содержащий фенол, глюкозооксидазу, пероксидазу, 4-аминоантипирин в калиево-фосфатном буфере.

Стандартный раствор глюкозы, 5,5 ммоль/л.

Определение концентрации глюкозы

	Опытные пробы, мл				Стандартная проба, мл
	до нагрузки	время после нагрузки			
		30 минут	60 минут	120 минут	
	1	2	2	3	4
Рабочий раствор	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Сыворотка крови	0,02	0,02	0,02	0,02	—
Стандарт глюкозы	—	—	—	—	0,02
	Содержимое пробирок перемешивают, инкубируют при 37°C в течение 15 минут. Измеряют оптическую плотность при длине волны 540 нм (зеленый светофильтр)				

Расчет

В каждом образце крови рассчитывают концентрацию глюкозы по формуле:

$$\text{Концентрация глюкозы, ммоль/л} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}}, \text{ где}$$

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

$C_{\text{ст}}$ – концентрация стандартного раствора глюкозы.

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

Также рассчитывают коэффициенты Бодуэна и Рафальского:

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

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

$$\text{Коэфф. Рафальского} = \frac{C_{\text{конеч}}}{C_{\text{исх}}}, \text{ где}$$

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

Нормальные величины

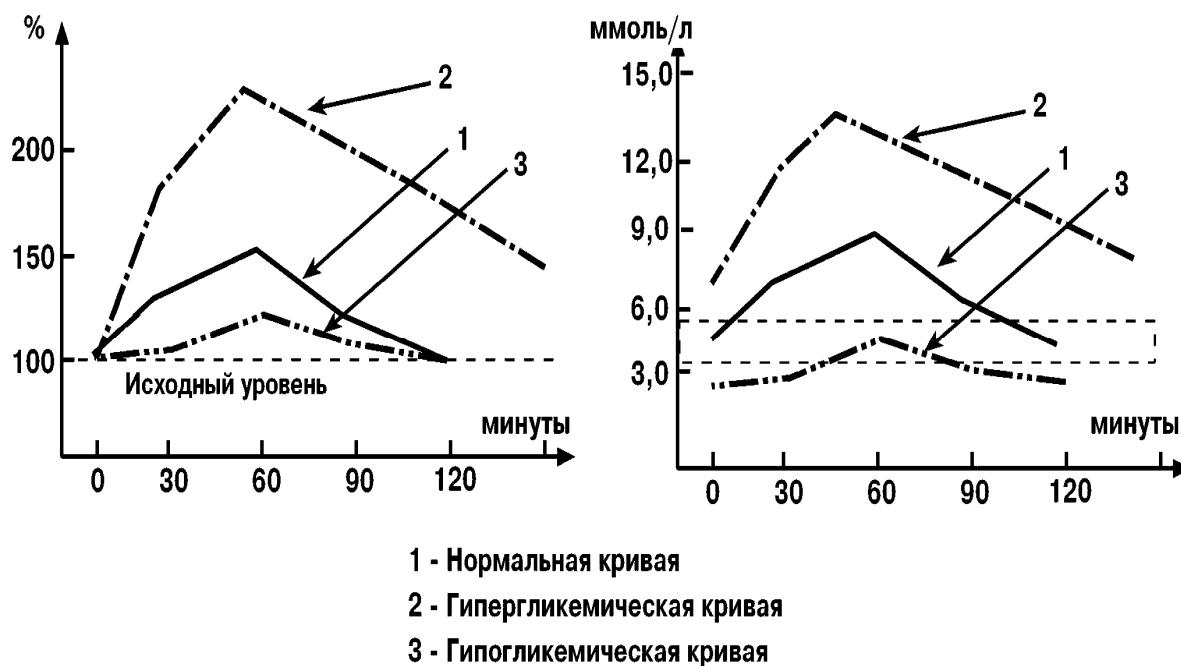
Натошак	3,3-5,8 ммоль/л	100%
Через 60 минут	6,7-8,5 ммоль/л	150-175%
Через 120 минут	ниже 6,7 ммоль/л	около 100%
Коэффициент Бодуэна		около 50%
Коэффициент Рафальского		0,9-1,04

Оценка гликемической кривой

Выделяют следующие типы гликемических кривых:

Тип кривой	Исходный уровень глюкозы	Максимальный подъем	Гипогликемическая фаза	Уровень глюкозы к концу 2 часа
Нормальная	Норма	Через 1 час	Через 2 часа или отсутствует	Исходный уровень
Гипергликемическая	Гипергликемия	Через 1,0-1,5 часа	Нет	Исходного уровня не достигает
Гипогликемическая	Гипогликемия	1 час	Нет	Исходный уровень

Результаты обследования обычно выражают графически, при этом их можно отражать в относительных или абсолютных единицах:



У здорового человека уровень глюкозы в крови после нагрузки глюкозой изменяется следующим образом:

1. Через 30 минут после приема глюкозы наблюдается увеличение содержания глюкозы в крови. Скорость повышения концентрации глюкозы в течение первых 30 минут (крутизна подъема) отражает силу рефлекторного раздражения окончаний симпатических нервов при попадании глюкозы в пищеварительный тракт и эффективность всасывания глюкозы в ЖКТ.

2. К 60 минуте наблюдается максимальное повышение концентрации глюкозы в крови – на 50-75% выше исходного. Промежуток от 30 до 60 минут связан с быстротой всасывания глюкозы, с общим состоянием печени и с ее гликогенсинтезирующей функцией.

3. Через 90-120 минут содержание глюкозы в крови возвращается к норме. Снижение уровня глюкозы в крови в этом периоде объясняется усиленным выделением инсулина из поджелудочной железы. Степень снижения отражает функциональную активность парасимпатического отдела нервной системы, гликогенсинтезирующую функцию печени, чувствительность к инсулину мышечной и жировой тканей. В ряде случаев концентрация глюкозы может опускаться ниже исходной величины, так как обычно выделяется больше инсулина, чем это требуется для восстановления нормального уровня глюкозы в крови, что и приводит к небольшой гипогликемии.

У здорового человека нагрузка глюкозой не вызывает глюкозурию.

Клинико-диагностическое значение

Гипергликемические кривые отмечаются при повреждениях паренхимы печени, заболеваниях центральной нервной системы, скрытых формах сахарного диабета, гиперфункции щитовидной железы и коры надпочечников, инфекционных заболеваниях (ревматизм, дифтерия, тиф, дизентерия, сепсис, бронхопневмония), панкреатите, гликогеновых болезнях.

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

Оформление работы

Записывают принцип построения гликемических кривых, отмечают полученные значения, строят по ним гликемическую кривую в абсолютных и относительных единицах.

Номер пробы	Концентрация глюкозы в крови			
	до нагрузки	Время после нагрузки		
		30 минут	60 минут	120 минут

Рассчитывают коэффициенты Рафальского и Бодуэна. Отмечают клинико-диагностическое значение метода. Делают вывод о возможных причинах изменения формы гликемических кривых.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один правильный ответ.

- МАЛЬТАЗА СИНТЕЗИРУЕТСЯ КЛЕТКАМИ
 - 1) поджелудочной железы
 - 2) слизистой желудка
 - 3) слизистой тонкого кишечника
 - 4) слизистой толстого кишечника
- УГЛЕВОД СО СТРУКТУРОЙ ГЛЮКОЗА–ФРУКТОЗА, СОЕДИНЕННЫХ α -1,2-ГЛИКОЗИДНОЙ СВЯЗЬЮ, НАЗЫВАЕТСЯ
 - 1) лактоза
 - 2) мальтоза
 - 3) сахароза
 - 4) фрагмент крахмала

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. АКТИВНО ПРОТЕКАЮТ ПРОЦЕССЫ АНАЭРОБНОГО ПРЕВРАЩЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ В ЛАКТАТ
 - 1) в клетках нервной ткани
 - 2) в клетках коркового слоя почек
 - 3) в эритроцитах
 - 4) в миокардиоцитах
6. КОНЕЧНЫЙ ПРОДУКТ ГЛИКОЛИЗА ЛАКТАТ МОЖЕТ БЫТЬ РЕСИНТЕЗИРОВАН В ГЛЮКОЗУ В КЛЕТКАХ
 - 1) мышечной ткани
 - 2) нервной ткани
 - 3) печени
 - 4) ткани почки
7. ПРИ КРАТКОМ ГОЛОДАНИИ АКТИВИРУЕТСЯ
 - 1) гликолиз в мышцах
 - 2) гликогенолиз в сердечной ткани
 - 3) гликогенолиз в печени
 - 4) синтез гликогена в печени
8. ПРИ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОМ (БОЛЕЕ СУТОК) ГОЛОДАНИИ АКТИВИРУЕТСЯ
 - 1) гликолиз в мышцах
 - 2) гликогенолиз в печени
 - 3) глюконеогенез
 - 4) синтез гликогена в печени
9. СКОРОСТЬ ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗА УВЕЛИЧИВАЕТСЯ
 - 1) кортизолом
 - 2) повышенной концентрацией АДФ и АМФ
 - 3) инсулином
 - 4) высокой концентрацией НАД и ФАД
10. РОЛЬ ПЕНТОЗОФОСФАТНОГО ПУТИ ЗАКЛЮЧАЕТСЯ В
 - 1) образовании глюкозы
 - 2) генерации НАДФН
 - 3) снабжении тканей АТФ
 - 4) образовании лактата

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

1. Ребенку 7 лет необходимо определить сахар крови для выявления сахарного диабета. Ребенок перед проведением пробы в лаборатории очень волновался, плакал. Установлено, что у ребенка уровень сахара в крови выше нормы.

Можно ли утверждать после такого исследования, что у ребенка сахарный диабет?

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

У которого из них выше содержание молочной кислоты в крови?

3. Как изменится соотношение между пентозофосфатным и гликолитическим путями обмена углеводов в костном мозге у больного, перенесшего кровотечение?

Почему? Активность каких ферментов целесообразно исследовать для проверки предположения?

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ К ИТОГОВОМУ ЗАНЯТИЮ

1. Роль углеводов в организме. Классификация углеводов по структуре и функциям. Строение основных представителей углеводов: моносахаридов (триозы, пентозы, гексозы), ди- и полисахаридов. Роль и структурные формулы гликозаминогликанов: нейраминовая и N-ацетилнейраминовая, гиалуроновая и хондроитинсерная кислоты. Примеры использования углеводов в качестве лекарственных препаратов.
2. Углеводы, находящиеся в продуктах питания. Где и какими ферментами происходит их переваривание? Механизм всасывания глюкозы. Роль целлюлозы в пищеварении. Причины intolerance к сахарозе и лактозе.
3. Исследование переваривания углеводов в желудочно-кишечном тракте. Принцип метода и ход исследования.
4. Обнаружение глюкозы в моче качественными реакциями Троммера и Феллинга. Принцип методов, ход проведения реакций, их практическое значение.
5. Роль печени в обмене углеводов при различных ситуациях. Особенности функционирования ферментов глюкокиназы и глюкозо-6-фосфатазы. Реакции взаимопревращения углеводов: метаболизм галактозы и фруктозы в организме и его нарушения.
6. Реакции биосинтеза гликогена и гликогенолиза, физиологическое значение процессов. Энергетический эффект использования гликогена в аэробных и анаэробных условиях. Регуляция активности фосфорилазы и синтазы гликогена (роль цАМФ, ионов кальция и кальмодулина). Особенности обмена гликогена в печени и в мышцах. Характеристика гликогенозов и агликогенозов, дефектные ферменты и последствия.
7. Источники и пути превращения глюкозы в тканях (схема). Характеристика окисления глюкозы в анаэробных условиях: последовательность реакций гликолиза, балансовое уравнение, энергетический эффект, регуляция, способ образования АТФ, локализация процесса. Дальнейшая судьба молочной кислоты. Укажите роль анаэробного распада глюкозы в эритроцитах и в мышечной ткани.
8. Последовательность реакций спиртового брожения, его балансовое уравнение, энергетический эффект, способ образования АТФ, локализация процесса. Сходства и отличия гликолиза и спиртового брожения.
9. Метаболизм этанола в организме человека. Локализация ферментов. В чем причина гипогликемии и лактоацидоза при алкогольном отравлении?

10. Определение концентрации глюкозы в сыворотке крови глюкозооксидазным методом. Принцип метода, ход определения, клинико-диагностическое значение, нормальные показатели.
11. Полуколичественный метод определения содержания глюкозы в моче методом Альтгаузена. Принцип метода, ход проведения, клинико-диагностическое значение, нормальные показатели.
12. Обнаружение молочной кислоты в мышцах реакцией Уффельмана. Принцип метода и ход анализа, практическое значение.
13. Реакции окисления глюкозы в аэробных условиях: последовательность реакций, энергетический эффект. Эффект Пастера, его биохимические механизмы. Реакции функционирования глицеролфосфатной и малат-аспартатной челночных систем, отметьте источник НАДН. Роль аэробного распада глюкозы в мозге.
14. Пентозофосфатный путь превращения глюкозы, локализация. Реакции окислительного этапа образования пентоз. Реакции неокислительного этапа (схема). Роль 1-го и 2-го этапов ПФП в жировой ткани и эритроцитах, в делящихся клетках, его связь с гликолизом. Регуляция процесса. Последствия энзимопатии глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы.
15. Последовательность реакций глюконеогенеза, укажите возможные предшественники, его значение. Регуляция глюконеогенеза. Глюкозо-лактатный цикл (цикл Кори) и глюкозо-аланиновый цикл (схемы), их роль. Реакции синтеза глюкозы из аминокислот на примере аланина, аспартата и глутамата.
16. Реакции обмена углеводов, сопровождающиеся образованием углекислого газа и использующие его.
17. Что такое аллостерическая регуляция ферментов? На какие ферменты влияют промежуточные метаболиты обмена углеводов, НАДН, АТФ и АМФ?
18. Регуляция концентрации глюкозы в крови. Источники и пути использования глюкозы крови. Влияние на эти процессы инсулина, глюкагона, адреналина и кортизола. Изменение обмена углеводов при голодании, при физической нагрузке и после еды.
19. Типы сахарного диабета. В чем заключается нарушение обмена углеводов при сахарном диабете I и II типов?
20. Тест толерантности к глюкозе. Принцип метода, этапы и ход проведения. Клинико-диагностическое значение теста. Нормальные значения гликемической кривой. Форма нормальной, гипо- и гипергликемических кривых. От чего зависит форма кривой?

21. Этапы обмена веществ и их взаимосвязь. Какие, кроме АТФ, существуют высокоэнергетические соединения? Цикл АТФ-АДФ. Основные способы фосфорилирования АДФ и пути использования АТФ. Общая схема катаболизма белков, жиров и углеводов в организме, специфические и общие пути катаболизма, их значение.
22. НАД-зависимые дегидрогеназы, катализируемые ими реакции обмена углеводов. Структурные формулы окисленной и восстановленной форм НАД. Характеристика витамина, входящего в состав НАД: биологическое название, признаки недостаточности, суточная потребность, пищевые источники.
23. ФАД-зависимые дегидрогеназы, катализируемые ими реакции обмена углеводов. Структурные формулы окисленной и восстановленной форм ФАД. Характеристика витамина, входящего в состав ФАД: биологическое название, признаки недостаточности, суточная потребность, пищевые источники.
24. Последовательность реакций окислительного декарбоксилирования пирувата, связь с дыхательной цепью. Регуляция процесса. Участие витаминов в процессе и их характеристика: биологическое название, признаки недостаточности, суточная потребность, пищевые источники.
25. Последовательность реакций цикла трикарбоновых кислот, связь с дыхательной цепью. Регуляция реакций. Участие витаминов в процессе, их характеристика, энергетический эффект.
26. Принцип окислительного фосфорилирования. Схема структурной организации дыхательной цепи. Сопряжение окисления с фосфорилированием. Строение H^+ -АТФ-синтазы. Коэффициент P/O для НАДН и ФАДН₂. Механизм дыхательного контроля. Каким образом влияет АТФ на окислительное фосфорилирование?
27. Разобщение дыхания и фосфорилирования. От чего зависит теплообразующая функция бурой жировой ткани? Ингибиторы дыхательной цепи. Причины гипозенергетических состояний. Коэффициент P/O и количество образующихся молекул АТФ при полном окислении глюкозы.

РАЗДЕЛ 9

СТРОЕНИЕ И ОБМЕН ЛИПИДОВ

ТЕМА 9.1. СТРОЕНИЕ И ВНЕШНИЙ ОБМЕН ЛИПИДОВ

АКТУАЛЬНОСТЬ

Липиды – низкомолекулярные органические вещества разнообразные по химической структуре и функциям, нерастворимые в воде, но растворимые в органических растворителях. К липидам относятся триацилглицеролы, сложные липиды (фосфолипиды, гликолипиды, сфинголипиды), холестерол (в том числе, как предшественник желчных кислот, гормонов, витамина D). Многочисленность биологических функций липидов определяет необходимость их изучения.

ЦЕЛЬ

Изучение строения и биологической роли липидов, особенностей их переваривания и всасывания.

Приобретение практических навыков по определению состава фосфолипидов, активности липазы в панкреатическом соке и роли желчных кислот в переваривании липидов.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Классификация липидов. Характеристика основных групп липидов по схеме:
 - химическая структура,
 - физико-химические свойства,
 - биологическая роль.
2. Характеристика жирных кислот по схеме:
 - классификация по числу атомов углерода, двойных связей и их положению,
 - источники насыщенных и полиненасыщенных жирных кислот для организма,
 - пути использования насыщенных и полиненасыщенных жирных кислот в клетке,
 - биологическая роль.
3. Жирные кислоты ω -6-ряда (линолевая, γ -линоленовая, арахидоновая кислоты) и ω -3-ряда (α -линоленовая, эйкозопентаеновая, докозгексаеновая кислоты). Их длина и положение двойных связей. Биологическая роль полиненасыщенных жирных кислот.
4. Характеристика производных эйкозотриеновой (ω -6), арахидоновой (ω -6) и эйкозопентаеновой (ω -3) кислот – эйкозаноиды (простагландины, простациклины, лейкотриены, тромбоксаны). Биологическая роль отдельных типов эйкозаноидов. Схема начальных реакций синтеза на примере арахидоновой кислоты.

- Роль ферментов – фосфолипаза A_2 , циклооксигеназа, липокси-геназа. Какие гормоны и лекарственные вещества влияют на синтез эйкозаноидов?
5. Строение триацилглицеролов, жирные кислоты, входящие в их состав. Характеристика класса триацилглицеролов (нейтральные жиры), их биологическая роль и функции.
 6. Химическая формула холестерина, его биологическая роль и функции. Производные холестерина.
 7. Характеристика сложных липидов:
 - глицерофосфолипиды (фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилхолин, фосфатидилинозитол), их химическая формула, биологические функции,
 - сфингофосфолипиды (сфингомиелины), их строение. Биологические функции сфинголипидов,
 - гликолипиды (цереброзиды, сульфоллипиды и ганглиозиды), их строение. Биологические функции гликолипидов.
 8. Внешний обмен липидов. Пищевые источники липидов, суточная потребность детей и взрослых в жидких и твердых жирах.
 9. Состав желчи и ее роль для организма и в переваривании липидов. Виды желчных кислот, их функции, строение. Реакции синтеза желчных кислот на примере холево́й кислоты, участие витаминов в этом процессе. Химическая формула таурохолевой и гликохолевой кислот. Причины и последствия нарушения желчеобразования и секреции желчи.
 10. Что такое эмульсия, в чем состоят характерные особенности эмульсий? Роль желчи и желчных кислот в эмульгировании пищевого жира. Схема эмульгированной капли жира.
 11. Ферменты, осуществляющие переваривание триацилглицеролов, фосфолипидов и эфиров холестерина в тонком кишечнике. Место образования и способ активации этих ферментов.
 12. Мицеллообразование продуктами переваривания жиров. Схема строения мицеллы, образуемой после окончания переваривания липидов. Какова их роль во всасывании липидов?
 13. Особенности переваривания липидов у детей.
 14. Возможные причины нарушения переваривания и всасывания пищевого жира. Причины гиповитаминозов и стеатореи при нарушении переваривания липидов.
 15. Ресинтез липидов в энтероцитах, его роль. Реакции ресинтеза триацилглицеролов, эфиров холестерина и фосфолипидов в стенке кишечника.
 16. Состав хиломикронов, их функции. Апобелки. Схема строения хиломикрона. Утилизация хиломикронов в тканях. Роль липопропротеинлипазы. От каких гормонов зависит ее активность?

17. Характеристика липопротеинов очень низкой плотности: их состав, соотношение липидных фракций, значение. Апобелки, их функция. Схема строения ЛПОНП. Где и когда образуются эти липопротеины? Утилизация ЛПОНП в тканях. Роль липопротеинлипазы.
18. Характеристика нарушений транспорта триацилглицеролов в ткани – дислипидопротеинемии I и V типов. Их причина и клинические последствия.
19. Изучение влияния желчи на активность липазы поджелудочной железы. Принцип метода.
20. Качественная реакция на желчные кислоты. Принцип метода.
21. Исследование состава фосфатидилхолина яичного желтка. Принцип определения составных элементов.

ТЕМЫ ДЛЯ РЕФЕРАТИВНЫХ СООБЩЕНИЙ

1. Использование липидов в качестве лекарственных препаратов и биологически активных добавок (эссенциале, лецитин, холевая кислота, ω -3-жирные кислоты и др.).
2. Ненасыщенные и полиненасыщенные жирные кислоты. Типы, структурная роль, участие в метаболизме и поведенческих реакциях.
3. Липосомы в медицине. Строение и характеристика липосом. Возможность использования для транспорта лекарственных средств в крови.
4. Гликолипиды, структура липидных и углеводных компонентов. Функции гликолипидов. Нарушение обмена гликолипидов.

Лабораторная работа 1

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЖЕЛЧИ НА АКТИВНОСТЬ ЛИПАЗЫ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Принцип

В присутствии желчи степень эмульгирования жиров возрастает. Под действием фермента липазы эмульгированные триацилглицеролы молока гидролизуются. Количество образовавшихся жирных кислот определяют при помощи титрования раствором щелочи в присутствии фенолфталеина. Сравнивая результаты определения количества жирных кислот в присутствии и в отсутствии желчи, выявляют ее влияние на активность панкреатической липазы.

Материал исследования

Свежее молоко, панкреатин (источник липазы), раствор желчи (источник желчных кислот и фосфолипидов).

Реактивы

- 1) 0,1 М р-р NaOH, 2) 0,5% спиртовой р-р фенолфталеина.

Проведение анализа

	Контроль, мл	Опыт 1, мл	Опыт 2, мл
Молоко	1,0	1,0	1,0
Дистил. вода	3,0	2,0	1,0
Панкреатин	—	1,0	1,0
Раствор желчи	—	—	1,0
Инкубируют 15 минут при 37°C			
0,5% фенолфталеин	1-2 капли	1-2 капли	1-2 капли
0,1 М раствор NaOH	Титруют до слабо-розовой окраски, не исчезающей в течение 30 секунд		

Результаты титрования фиксируют следующим образом:

V_K – количество мл щелочи, потраченной на титрование контрольной пробы. Показатель отражает исходное количество органических кислот, в том числе и жирных;

V_1 – количество мл щелочи, потраченной на титрование опыта 1;

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

Расчет

1. Количество жирных кислот, образовавшихся при ферментативном гидролизе жира молока без желчи:

$$X_1 = V_1 - V_K$$

2. Количество жирных кислот, образовавшихся при ферментативном гидролизе жира молока в присутствии желчи:

$$X_2 = V_2 - V_K$$

3. Рассчитывают степень влияния желчи на активность липазы:

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

Практическое значение

Определение активности липазы применяется в клинике после взятия кишечного сока с помощью зонда для установления причин патологии переваривания липидов. При отсутствии желчи процесс переваривания липидов резко нарушается.

В фармации метод исследования активности липазы необходим для контроля качества лекарственных препаратов (панкреатин, фестал и др.), содержащих этот фермент.

Оформление работы

Записывают принцип метода и ход работы. Рассчитывают результаты и делают вывод о влиянии желчи на переваривание жиров молока.

Лабораторная работа 2

КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ЖЕЛЧНЫЕ КИСЛОТЫ (РЕАКЦИЯ ПЕТТЕНКОФЕРА)

Принцип

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

Материал исследования

Раствор желчи (2:1)

Реактивы

1) 20% р-р сахарозы, 2) конц. H_2SO_4 .

Проведение анализа

На сухое предметное стекло, под которое подложен лист белой бумаги, наносят 1 каплю желчи, 1 каплю 20% раствора сахарозы и перемешивают стеклянной палочкой. Не двигая стекло, рядом наносят 3 капли концентрированной H_2SO_4 . Через 2-3 минуты на месте слияния капель наблюдается красная окраска, переходящая в красно-фиолетовую.

Оформление работы

Записывают принцип метода, ход работы и фиксируют результаты. Делают выводы о возможности использования данного метода для обнаружения желчных кислот.

Лабораторная работа 3

ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА ФОСФАТИДИЛХОЛИНА

Принцип

Метод основан на гидролизе фосфатидилхолина (лецитина) яичного желтка при нагревании в растворе NaOH с последующим определением в гидролизате его структурных компонентов: жирных кислот, глицерола, холина, фосфорной кислоты.

Материал исследования

Сухой желток куриного яйца.

Реактивы

1) 10% р-р NaOH, 2) 10% р-р HCl, 3) конц. HNO_3 , 4) молибденовый реактив, 5) 1% р-р $CuSO_4$.

Проведение анализа

1. Гидролиз фосфатидилхолина

Кусочек яичного желтка помещают в пробирку, добавляют 1-2 мл 10% раствора NaOH, кипятят в водяной бане 15 минут.

Открытие холина	Холин при нагревании в щелочной среде превращается в триметиламин $N(CH_3)_3$, который обнаруживается в конце гидролиза по запаху селедочного рассола
------------------------	--

2. Гидролизат делят на 3 пробирки

Открытие жирных кислот	К гидролизату 1-й пробирки прибавляют по каплям 10% раствор HCl до появления хлопьевидной взвеси жирных кислот
Открытие фосфорной кислоты	Ко 2-й части гидролизата осторожно добавляют 5-7 капель концентрированной HNO_3 и по каплям молибденовый реактив до появления желтого осадка фосфомолибдата аммония. При необходимости нагревают в кипящей водяной бане. После охлаждения пробирки в струе воды фосфомолибдат аммония выпадает в осадок
Обнаружение глицерола	К 3-й части гидролизата добавляют 5 капель 10% раствора $NaOH$ и 1 каплю 1% раствора $CuSO_4$, перемешивают. Образуется хелатное соединение меди с глицеролом ярко-синего цвета

Оформление работы

Записывают результат реакций и выводы в виде таблицы:

Продукты гидролиза фосфатидилхолина	Результат реакции	Вывод о наличии
Холин Жирные кислоты Фосфорная кислота Глицерол		

ТЕМА 9.2. ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ОБМЕН ЖИРНЫХ КИСЛОТ И ТРИАЦИЛГЛИЦЕРОЛОВ

АКТУАЛЬНОСТЬ

Триацилглицеролы (нейтральные жиры) – сложные эфиры глицерола и высших жирных кислот. Знание особенностей обмена нейтральных жиров необходимо для понимания метаболических сдвигов при голодании и мышечной работе, для изучения патогенеза таких заболеваний, как ожирение, сахарный диабет, атеросклероз.

Знакомство с методом определения в крови содержания триацилглицеролов позволяет использовать эти сведения для диагностики заболеваний, связанных с нарушением липидного обмена.

ЦЕЛЬ

Изучение метаболизма триацилглицеролов и его регуляции. Транспортные формы триацилглицеролов.

Приобретение практических навыков определения качества пищевого жира, концентрации триацилглицеролов в крови и кетоновых тел в моче.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Реакции цикла трикарбоновых кислот, их связь с дыхательной цепью и выход энергии. Процесс окислительного фосфорилирования. Понятие дыхательного контроля.
2. Характеристика синтеза жирных кислот из глюкозы по плану:
 - локализация и условия протекания процесса,
 - реакции образования ацетил-SКоА из глюкозы,
 - роль цитрата в переносе ацетильной группы в цитозоль, его дальнейшие превращения,
 - реакция синтеза малонил-SКоА,
 - строение мультиферментного синтазного комплекса, химизм реакций, происходящих в комплексе,
 - конечный продукт синтеза,
 - участие витаминов и коферментов, источники НАДФН, роль "малик"-фермента,
 - регуляция процесса при участии гормонов инсулина, адреналина, глюкагона,
 - влияние АТФ, ацил-SКоА, малонил-SКоА, цитрата на реакции синтеза жирных кислот.
3. Реакции синтеза глицерол-3-фосфата из глюкозы. Локализация и роль процесса.
4. Реакции синтеза фосфатидной кислоты из жирных кислот и глицерол-3-фосфата по плану:
 - локализация в клетке,
 - источники глицерол-3-фосфата, жирных кислот и энергии,
 - последовательность реакций,
 - связь с обменом углеводов,
 - дальнейшие пути использования фосфатидной кислоты.
5. Строение триацилглицеролов, их жирно-кислотный состав. Реакции синтеза триацилглицеролов (липогенез). Условия протекания липогенеза в печени и жировой ткани. Связь синтеза триацилглицеролов с обменом углеводов.
6. Источники ТАГ в печени. Характеристика липопротеинов очень низкой плотности: их состав, апобелки, функция. Схема строения ЛПОНП. Условия, при которых образуются эти липопротеины. Утилизация ЛПОНП в тканях. Роль липопротеинлипазы.
7. Сходство и отличие биосинтеза триацилглицеролов в жировой ткани и печени.
8. Характеристика реакций липолиза по плану:
 - локализация и условия протекания процесса,
 - последовательность реакций и ферменты,

- конечные продукты,
 - гормональная регуляция процесса,
 - транспорт и использование свободных жирных кислот, образующихся при липолизе.
9. Гормоночувствительная липаза, роль аденилатциклазной системы в регуляции ее активности. Регуляция липазы гормонами адреналином, глюкагоном, кортизолом и инсулином. Аллостерическая регуляция активности ферментов липолиза и липогенеза.
10. Реакции окисления глицерола до пирувата. Возможные пути метаболизма пирувата. Энергетический выход окисления пирувата в аэробных и анаэробных условиях.
11. Реакции окисления жирных кислот до углекислого газа и воды:
- роль карнитина в окислении жирных кислот,
 - локализация и условия протекания β -окисления,
 - последовательность реакций β -окисления и ферменты,
 - участие витаминов и коферментов,
 - конечные продукты,
 - связь с ЦТК и дыхательной цепью,
 - энергетический выход процесса,
 - расчет энергетической ценности β -окисления пальмитиновой кислоты.
12. Особенности обмена триацилглицеролов при некоторых физиологических состояниях (потребление пищи, голодание, мышечная активность). В чем особенность бурой жировой ткани?
13. Причины нарушений обмена триацилглицеролов – ожирение, гиперлиппротеинемия I типа (гиперхиломикронемия) и V типа.
14. Реакции синтеза кетоновых тел. Условия, локализация и роль процесса. Реакции утилизации кетоновых тел в тканях. Причины кетоацидоза при голодании и сахарном диабете. Роль дефицита оксалоацетата для активации кетогенеза.
15. Определение кислотного числа жира. Принцип метода, его практическое значение и нормальные показатели.
16. Исследование концентрации триацилглицеролов в сыворотке крови. Клинико-диагностическое значение и нормальные показатели.
17. Обнаружение кетоновых тел в моче. Изучение концентрации кетоновых тел в моче. Принцип методов. Клинико-диагностическое значение и нормальные показатели.

ТЕМЫ ДЛЯ РЕФЕРАТИВНЫХ СООБЩЕНИЙ

1. Белая и бурая жировая ткань. Распределение в организме и метаболические особенности. Роль в организме.

2. Первичные и вторичные ацетонемические состояния у детей.
3. Современные представления о роли L-карнитина в организме. Участие карнитина в пре- и постнатальном развитии ребенка. Предполагаемая роль карнитина в патогенезе синдрома "смерти в колыбели".

Лабораторная работа 1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИСЛОТНОГО ЧИСЛА ПИЩЕВОГО ЖИРА

Принцип

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

Материал исследования

Свежее и старое растительное масло.

Реактивы

1) 0,1 М р-р КОН, 2) 1,0% р-р фенолфталеина, 3) бутанол.

Проведение анализа

	Опыт 1, мл	Опыт 2, мл
Свежее растительное масло	0,5	—
Старое растительное масло	—	0,5
Бутанол	0,5	0,5
1,0% раствор фенолфталеина	1-2 капли	1-2 капли
0,1 М раствор КОН	Титруют до светло-розового окрашивания, не исчезающего в течение минуты	

Расчет

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

a – количество раствора щелочи (мл), израсходованное на титрование; 0,00561 – титр 0,1 М раствора КОН; b – объем жира (мл); 0,9 – плотность жира (г/мл); 1000 – коэффициент перевода мг в г.

Нормальные величины

Свежее растительное масло

1-3 ед

Практическое значение

Кислотное число жира отражает количество жирных кислот в пищевом продукте и используется для определения качества пищевого жира.

Изменение количества и состава пищевого жира при хранении носит название **прогоркания жиров**. Прогоркание жира обусловлено появлением в его составе летучих альдегидов, кетонов, жирных кислот невысокой молекулярной массы и нелетучих веществ перекисного характера.

Причиной прогоркания служат два вида факторов: **биологические** и **химические**. К группе биологических факторов относят микроорганизмы, осуществляющие превращение и гидролиз жирных кислот. Химическое прогорание (перекисное окисление липидов) связано с ультрафиолетовым облучением, тепловыми процессами, с окислением кислородом воздуха двойных связей жирных кислот, находящихся в составе триацилглицеролов и фосфолипидов.

Оформление работы

Записывают принцип метода, ход работы. Отмечают результаты для свежего и прогорклого растительного масла. Делают вывод об особенностях состава жирных кислот.

Лабораторная работа 2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ТРИАЦИЛГЛИЦЕРОЛОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Принцип

Метод основан на использовании сопряженных ферментативных реакций, осуществляемых: 1) липазой, катализирующей гидролиз триацилглицеролов до спирта глицерола и жирных кислот; 2) глицеролкиназой, катализирующей фосфорилирование глицерола; 3) глицеролфосфатоксидазой, окисляющей глицерол-3-фосфат в присутствии O_2 до диоксиацетонфосфата с образованием H_2O_2 ; 4) пероксидазой, катализирующей в присутствии хлорфенола окисление перекисью водорода 4-аминоантипирина с образованием хинонимина, окрашенного продукта розово-малинового цвета.

Материал исследования

Сыворотка крови.

Реактивы

Рабочий реактив: раствор липазы, глицеролкиназы, глицеролфосфатоксидазы, пероксидазы, хлорфенола, 4-аминоантипирина в буферном растворе. Стандартный раствор триацилглицерола (триолеат), 2,29 ммоль/л.

Проведение анализа

	Опыт,мл	Стандарт,мл
Сыворотка крови	0,03	—
Стандартный р-р триацилглицерола	—	0,03
Рабочий реактив	3,0	3,0
	Инкубируют 20 минут при 20-25°С, измеряют оптическую плотность опытной и стандартной проб против воды при 540 нм (зеленый светофильтр)	

Расчет

Концентрация триацилглицеролов, 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 стандартного раствора

Нормальные показатели

Сыворотка крови	дети	0,15-1,56 ммоль/л
	взрослые	0,45-1,71 ммоль/л

Клинико-диагностическое значение

Определение концентрации триацилглицеролов наиболее информативно для типирования первичного нарушения их обмена – гиперлипопротеинемий.

Повышение уровня триацилглицеролов наблюдается при ожирении, сахарном диабете, гипертонической болезни, ишемической болезни сердца, панкреатитах, хронической почечной недостаточности и нефротическом синдроме, гипотиреозе, атеросклерозе, алкоголизме.

Снижение концентрации триацилглицеролов отмечается при гипертиреозе, хронических обструктивных заболеваниях легких, терминальных стадиях поражения печени, синдроме мальабсорбции.

Оформление работы

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

Лабораторная работа 3

ОБНАРУЖЕНИЕ КЕТОНОВЫХ ТЕЛ В МОЧЕ

Материал исследования

Нормальная моча и моча с ацетоном.

Реактивы

1) 10% р-р нитропруссид натрия, 2) 10% р-р NaOH, 3) р-р Люголя, 4) 5% р-р FeCl₃, 5) конц. CH₃COOH.

Качественная проба Легалля на ацетон и ацетоуксусную кислоту

Принцип

Метод основан на способности ацетона и ацетоуксусной кислоты в щелочной среде образовывать с нитропруссидом натрия комплексы оранжево-красного цвета, переходящие при подкислении раствора в соединения вишнево-красного цвета.

Проба более чувствительна к ацетоуксусной кислоте, чем к ацетону, с β -гидроксимасляной кислотой реакция не идет.

Проведение анализа

	Опыт 1, капли	Опыт 2, капли
Нормальная моча	10	—
Моча с ацетоном	—	10
10% р-р нитропруссиды Na	2	2
10% раствор NaOH	4	4
	Появляется оранжево-красное окрашивание	
Конц. CH_3COOH	10	10
	При наличии кетоновых тел появляется вишнево-красное окрашивание. Если кетоны отсутствуют, то при подкислении цвет раствора переходит в желтый (происходит реакция на креатинин в моче)	

Нормальные величины

Моча отсутствие

Качественная проба Либена на ацетон

Принцип

Ацетон в щелочной среде в присутствии раствора Люголя (раствор йода в KI) образует желтый осадок йодоформа, обладающего специфическим запахом.

Проведение анализа

	Опыт 1, капли	Опыт 2, капли
Нормальная моча	20	—
Моча с ацетоном	—	20
10% р-р NaOH	2	2
Р-р Люголя	Добавляют до слабо-желтой окраски раствора.	
	При наличии ацетона жидкость мутнеет вследствие выделения бледно-желтого осадка йодоформа, обладающего характерным запахом	

Нормальные величины

Моча отсутствие

Клинико-диагностическое значение

Кетоновые тела в моче (кетонурия) появляются при кетонемии, которая возникает при голодании, сахарном диабете, при повышении концентрации жиромобилизующих гормонов в крови.

Оформление работы

Записывают принцип методов, отображают получаемую окраску, присутствие (+) или отсутствие (–) кетоновых тел. В выводах указывают состояния, при которых в моче обнаруживаются кетоновые тела.

Название метода	Материал исследования		Результаты реакции	Наличие кетоновых тел
Проба Легаля	Моча	нормальная		
		с ацетоном		
Проба Либена	Моча	нормальная		
		с ацетоном		

ТЕМА 9.3. ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ОБМЕН ФОСФОЛИПИДОВ И ХОЛЕСТЕРОЛА. ТРАНСПОРТ ЛИПИДОВ В КРОВИ

АКТУАЛЬНОСТЬ

Фосфолипиды и холестерол входят в состав клеточных мембран, участвуют в образовании липопротеинов. При нарушении синтеза фосфолипидов будет изменяться нормальный метаболизм клеток и образование транспортных липопротеинов.

Нарушения обмена холестерола проявляются такими распространенными заболеваниями, как атеросклероз и желчекаменная болезнь.

В кардиологии используют лекарственные препараты, оказывающие влияние на реакции синтеза холестерола в тканях, на обмен липопротеинов низкой и высокой плотности в плазме крови.

ЦЕЛЬ

Изучение обмена, транспорта и функций фосфолипидов и холестерола.

Приобретение практических навыков, позволяющих изучить концентрацию общего холестерола в сыворотке крови.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Строение фосфолипидов: фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилхолин, фосфатидилинозитол. Биологическая роль.
2. Катаболизм фосфолипидов. Ферменты, расщепляющие фосфолипиды в кишечнике и тканях. Роль фосфолипаз A₂ и C.
3. Характеристика синтеза фосфатидной кислоты из жирных кислот и глицерола по плану:
 - локализация в клетке,
 - источники глицерола, жирных кислот и энергии,

- последовательность реакций,
 - связь с обменом углеводов,
 - дальнейшие пути использования фосфатидной кислоты.
4. Реакции взаимосвязи обмена глицина, серина, метионина, участие в них витаминов В₆, В₁₂ и фолиевой кислоты (см. Тема 5.4.). Реакция синтеза S-аденозилметионина из S-аденозилгомоцистеина, его роль в процессах трансметилирования при синтезе ряда веществ, в том числе фосфатадилхолина.
 5. Реакции биосинтеза фосфолипидов в тканях. Два пути биосинтеза фосфолипидов. Роль аминокислот и витаминов в этом процессе. Липотропные вещества, реакции, в которых они участвуют. Причины нарушения синтеза фосфолипидов. Причины и последствия жирового перерождения печени.
 6. Химическое строение и биологическая роль холестерина. Пищевые источники холестерина. Пути выведения холестерина из организма.
 7. Характеристика транспорта свободного холестерина и его эфиров в плазме крови. Состав и строение липопротеинов низкой и высокой плотности. Типы апобелков, их функции. Метаболизм ЛПНП и ЛПВП в плазме крови. Реакция, катализируемая лецитин:холестерол-ацилтрансферазой (ЛХАТ).
 8. Локализация и роль апо-В100-рецептора. Значение рецепторопосредованного эндоцитоза ЛПНП и пути метаболизма их компонентов после эндоцитоза. Роль ацил-SКоА:холестерол-ацилтрансферазы (АХАТ).
 9. Реакции синтеза мевалоновой кислоты. Схема дальнейших этапов синтеза холестерина. Связь синтеза холестерина с обменом углеводов. Регуляция синтеза. Гормональный и аллостерический механизмы регуляции. Лекарственная регуляция синтеза холестерина.
 10. Характеристика нарушений обмена холестерина – гиперлиппротеинемия IIa типа (семейная гиперхолестеролемия), атеросклероз (по стадиям), желчекаменная болезнь. Причины, последствия, основы лечения.
 11. Характеристика образования в организме ацетил-SКоА: катаболизм глюкозы, аминокислот, жирных кислот и кетоновых тел. Пути использования ацетил-SКоА: ЦТК, синтез жирных кислот, холестерина, кетоновых тел. При каких условиях и в каких органах происходят те или иные процессы?
 12. Липидозы: лизосомные болезни накопления липидов. Представление о болезнях Нимана-Пика, Гоше и Тея-Сакса.
 13. Определение концентрации холестерина в сыворотке крови. Принцип метода, его клинико-диагностическое значение, нормальные показатели.

ТЕМЫ ДЛЯ РЕФЕРАТИВНЫХ СООБЩЕНИЙ

1. Атеросклероз, причины, патогенез, последствия. Современные подходы к лечению атеросклероза.
2. Метаболический синдром (синдром X). Его связь с ожирением, атеросклерозом, сахарным диабетом II типа, гипертензией. Причины. Основы лечения.
3. Болезни накопления липидов: Нимана-Пика, Тея-Сакса, Гоше, Шюллера-Кристиана, Вольмана. Молекулярные причины, патогенез. Основы лечения.

Лабораторная работа 1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ХОЛЕСТЕРОЛА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Принцип

Метод основан на использовании сопряженных ферментативных реакций. Холестеролэстераза осуществляет гидролиз эфиров холестерина; затем холестеролоксидаза, превращает холестерол в холестенон с образованием H_2O_2 . Пероксид водорода в присутствии фенола с участием пероксидазы окисляет 4-аминоантипирин с образованием продукта хинонимина розово-малинового цвета. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию холестерина и определяется фотокolorиметрически.

Материал исследования

Сыворотка крови.

Реактивы

1) Рабочий реактив: раствор холестеролэстеразы, холестеролоксидазы, пероксидазы, фенола, 4-аминоантипирина в 0,1 М калиево-фосфатном буфере.

Стандартный раствор холестерина, 4,65 ммоль/л.

Материал исследования

Сыворотка крови.

Проведение анализа

	Опыт, мл	Стандарт, мл
Сыворотка крови	0,02	—
Стандартный р-р холестерина	—	0,02
Рабочий реактив	2,0	2,0
Инкубируют 20 минут при 37°C, измеряют оптическую плотность опытной и стандартной проб против воды при 540 нм (зеленый светофильтр)		

Расчет

$$\text{Концентрация холестерина, ммоль/л} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}}, \text{ где}$$

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

Нормальные величины

Сыворотка крови	дети	1,2-5,2 ммоль/л
	взрослые	3,0-5,2 ммоль/л

Клинико-диагностическое значение

Холестеролемиа более 5,2 ммоль/л является фактором повышенного риска атеросклероза и его клинических осложнений – ишемической болезни сердца, инсульта. Высокое содержание холестерина в крови наблюдается при гиперлиппротеинемиях IIa и IIб, III типов, нефротическом синдроме, сахарном диабете I типа, гипотиреозе, поражениях почек, внутри- и внепеченочном холестазах.

Уменьшение концентрации холестерина в крови (гипохолестеролемиа) отмечается при голодании и синдроме мальабсорбции, при гипертиреозе, остром панкреатите, циррозе печени, злокачественных опухолях.

Оформление работы

Записывают принцип метода, ход работы и результаты анализа, отмечают клинико-диагностическое значение. Делают вывод о возможных патологиях.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один правильный ответ.

- СТЕРОИДАМИ ЯВЛЯЮТСЯ
 - желчные кислоты
 - ганглиозиды
 - сфингомиелины
 - гормоны гипофиза
- НЕЗАМЕНИМЫМ ФАКТОРОМ ПИТАНИЯ ЯВЛЯЕТСЯ
 - холестерол
 - фосфатидилхолин
 - линоленовая кислота
 - олеиновая кислота
- КАТАБОЛИЗМ ВЫСШИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ПРОИСХОДИТ ПО ПУТИ, КОТОРЫЙ НАЗЫВАЕТСЯ
 - декарбоксилирование

- 2) гликогенолиз
 - 3) β -окисление
 - 4) липолиз
4. ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ МИТОХОНДРИЙ ОСТАТОК ЖИРНОЙ КИСЛОТЫ ПЕРЕНОСИТ
- 1) карнозин
 - 2) карнитин
 - 3) креатин
 - 4) кератин
5. ИСТОЧНИКОМ НАДФН ДЛЯ СИНТЕЗА ЖИРНЫХ КИСЛОТ ЯВЛЯЕТСЯ
- 1) пентозофосфатный путь
 - 2) катаболизм триацилглицеролов
 - 3) окислительное декарбоксилирование пирувата
 - 4) реакции гликолиза
6. В СОСТАВЕ ХИЛОМИКРОНОВ ОБНАРУЖИВАЕТСЯ
- 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 ИСПОЛЬЗУЮТ
- 1) нервные клетки
 - 2) скелетные мышцы
 - 3) сердце
 - 4) печень
8. ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ГОЛОДАНИИ АКТИВИРУЕТСЯ
- 1) липогенез в жировой ткани
 - 2) β -окисление в печени
 - 3) синтез холестерина в нервной ткани
 - 4) цикл трикарбоновых кислот в печени
9. КЛЮЧЕВУЮ РЕАКЦИЮ СИНТЕЗА ХОЛЕСТЕРОЛА КАТАЛИЗИРУЕТ
- 1) гидроксиметилглутарил-SКоА-редуктаза
 - 2) ацилтрансфераза
 - 3) пируваткиназа
 - 4) ацетоацетил-SКоА-синтаза
10. ВЫБЕРИТЕ ГОРМОНЫ, СТИМУЛИРУЮЩИЕ СИНТЕЗ ЖИРОВ В ЖИРОВОЙ ТКАНИ
- 1) адреналин
 - 2) глюкагон
 - 3) соматотропный гормон
 - 4) инсулин

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

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

Влияет ли это на переваривание жиров? Какие последствия может иметь такая патология?

2. Содержание триацилглицеролов и фосфолипидов в сердечной мышце в 1,5-2 раза больше, чем в скелетной.

Какой биохимический смысл имеет это различие?

Не связана ли с ним высокая чувствительность миокарда к кислородной недостаточности?

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.

С нарушением какого обмена это связано?

Какой биохимический анализ подтвердит нарушение этого вида обмена?

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ К ИТОГОВОМУ ЗАНЯТИЮ

1. Структурные формулы и характеристика основных классов липидов.
2. Типы высших жирных кислот, их физико-химические свойства и биологическая роль, их пищевые источники. Структура пальмитиновой, стеариновой и олеиновой кислот, полиненасыщенных жирных кислот ω -6-ряда (линолевая, γ -линоленовая, арахидоновая кислоты) и ω -3-ряда (α -линоленовая, эйкозопентаеновая, докозгексаеновая кислоты). Транспорт жирных кислот в крови.
3. Производные полиненасыщенных жирных кислот ω -6-ряда и ω -3-ряда, биологическая роль отдельных типов эйкозаноидов. Начальные реакции синтеза на примере арахидоновой кислоты, роль фосфолипазы A_2 , циклооксигеназы, липоксигеназы. Какие гормоны и лекарственные вещества влияют на синтез эйкозаноидов?
4. Триацилглицеролы: химическая структура, жирные кислоты, входящие в состав триацилглицеролов, физико-химические свойства, биологическая роль. Транспорт триацилглицеролов в крови.
5. Фосфолипиды: химическая структура (фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилхолин, фосфатидилинозитол), жирные кислоты, входящие в состав фосфолипидов, физико-химические свойства, биологическая роль. Какую роль выполняют фосфолипиды в транспорте липидов в крови?
6. Представление о химической структуре сфинголипидов (сфингомиелины) и гликолипидов (цереброзиды, сульфоллипиды, ганглиозиды), их биологической роли и функциях.
7. Строение холестерина и его эфиров, его биологическая роль. Транспорт холестерина в крови.
8. Суточная потребность и пищевые источники жира. Роль ферментов и компонентов желчи в переваривании пищевых липидов в ЖКТ. Синтез желчных кислот, роль витаминов в этом процессе. Химическое строение таурохолевой и гликохолевой кислот. Ресинтез липидов в стенке кишечника. Последствия нарушений переваривания и всасывания липидов.
9. Характеристика хиломикронов и липопротеинов очень низкой плотности, их состав, схема строения, функции, реакции метаболизма в кровотоке. Утилизация хиломикронов и ЛПОНП в тканях. Роль липопротеинлипазы. Какими гормонами она активируется?
10. Качественная реакция на желчные кислоты. Принцип метода и ход определения.

11. Исследование влияния желчи на активность панкреатической липазы. Принцип метода, практическое значение метода.
12. Обнаружение компонентов фосфатидилхолина яичного желтка. Принцип метода и ход определения.
13. Липолиз, химизм реакций, роль липолиза. Регуляция липолиза. В каких физиологических ситуациях он происходит? Транспорт и использование жирных кислот, образующихся при липолизе. Аденилатциклазный механизм активации ТАГ-липазы. Механизм влияния на липолиз инсулина, адреналина, глюкагона.
14. Реакции β -окисления жирных кислот, отметьте связь с ЦТК и дыхательной цепью. Энергетический выход процесса на примере пальмитиновой, стеариновой и пальмитоолеиновой кислот.
15. Пути образования и пути использования ацетил-SКоА в организме (схема).
16. Реакции синтеза кетоновых тел. Причины кетонемии и кетонурии при голодании и сахарном диабете.
17. Проведение реакций Либена и Легалья на кетоновые тела в моче. Определение концентрации кетоновых тел с помощью тест-полосок. Клинико-диагностическое значение анализа и нормальные показатели.
18. Реакции синтеза жирных кислот из глюкозы. Ключевые стадии и локализация процесса, роль цитрата. Регулируемые ферменты. Состав мультиферментного синтетазного комплекса.
19. Реакции синтеза глицерол-3-фосфата из глюкозы и реакции окисления глицерола до пировиноградной кислоты. Дальнейшая судьба пирувата. Энергетический выход процесса.
20. Химизм реакций синтеза триацилглицеролов. В каких условиях и где происходит липогенез? Отличия биосинтеза жиров в жировой ткани и в печени. Регуляция липогенеза. Источники глицерола, жирных кислот и энергии. Взаимосвязь синтеза триацилглицеролов с обменом глюкозы.
21. Особенности обмена триацилглицеролов и насыщенных жирных кислот при некоторых физиологических состояниях (потребление пищи, голодание, мышечная активность, сахарный диабет I и II типов).
22. Определение кислотного числа жира. Принцип метода, ход анализа, нормальные показатели. Прогоркание жиров.
23. Исследование концентрации триацилглицеролов в сыворотке крови. Принцип, ход определения, клинико-диагностическое значение и нормальные показатели.
24. Пути синтеза фосфолипидов, их отличие. Химизм реакций синтеза фосфолипидов. Роль аминокислот и витаминов. Источ-

- ники энергии для синтеза фосфолипидов. Что такое липотропные вещества? Их функции. Последствия недостатка липотропных соединений.
25. Обмен и функции холестерина: синтез до мевалоновой кислоты, представление о дальнейших этапах, регуляция синтеза, связь с углеводным обменом. Пути выведения холестерина из организма.
26. Определение холестерина в крови. Принцип метода, ход определения, клинико-диагностическое значение, нормальные величины.
27. Характеристика липопротеинов высокой и низкой плотности: роль в обмене холестерина и его эфиров, основные апо-белки липопротеинов. Взаимодействие ЛПНП и ЛПВП в плазме крови. Роль лецитин-холестерол-ацилтрансферазы. Утилизация ЛПНП в клетках. Внутриклеточное использование холестерина и выведение его избытка из клетки. Роль ацил-SКоА-холестерол-ацилтрансферазы.
28. Взаимосвязь обмена липидов и углеводов. Превращение глюкозы в жирные кислоты, триацилглицеролы и холестерол (схема). Роль пентозофосфатного пути для синтеза жиров.
29. Гормональная и аллостерическая регуляция обмена липидов. Механизм влияния инсулина, глюкагона, адреналина, глюкокортикоидов на липолиз и липогенез, синтез и β -окисление жирных кислот, синтез холестерина.
30. Биохимический механизм нарушений обмена липидов: атеросклероз, желчекаменная болезнь, ожирение, жировая инфильтрация печени, сахарный диабет II типа, гиперлиппротеинемии I типа (хиломикронемия), V типа и IIa типа (семейная гиперхолестеролемиа). Что такое болезни Тея-Сакса, Нимана-Пика, Гоше?
31. Этапы обмена веществ и их взаимосвязь. Какие, кроме АТФ, существуют высокоэнергетические соединения? Цикл АТФ-АДФ. Основные способы фосфорилирования АДФ и пути использования АТФ. Общая схема катаболизма белков, жиров и углеводов в организме, специфические и общие пути катаболизма, их значение.
32. НАД-зависимые дегидрогеназы, катализируемые ими реакции обмена углеводов. Структурные формулы окисленной и восстановленной форм НАД. Характеристика витамина, входящего в состав НАД: биологическое название, признаки недостаточности, суточная потребность, пищевые источники.
33. ФАД-зависимые дегидрогеназы, катализируемые ими реакции обмена углеводов. Структурные формулы окисленной и восстановленной форм ФАД. Характеристика витамина, входя-

- щего в состав ФАД: биологическое название, признаки недостаточности, суточная потребность, пищевые источники.
34. Последовательность реакций окислительного декарбоксилирования пирувата, связь с дыхательной цепью. Регуляция процесса. Участие витаминов в процессе и их характеристика: биологическое название, признаки недостаточности, суточная потребность, пищевые источники.
35. Последовательность реакций цикла трикарбоновых кислот, связь с дыхательной цепью. Регуляция реакций. Участие витаминов в процессе, их характеристика, энергетический эффект.
36. Принцип окислительного фосфорилирования. Схема структурной организации дыхательной цепи. Сопряжение окисления с фосфорилированием. Строение H^+ -АТФ-синтазы. Коэффициент P/O для НАДН и ФАДН₂. Механизм дыхательного контроля. Каким образом влияет АТФ на окислительное фосфорилирование?
37. Разобщение дыхания и фосфорилирования. От чего зависит теплообразующая функция бурой жировой ткани? Ингибиторы дыхательной цепи. Причины гипоэнергетических состояний. Коэффициент P/O и количество образующихся молекул АТФ при полном окислении пальмитиновой кислоты.

РАЗДЕЛ 10

ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ И ФУНКЦИЙ ОРГАНИЗМА

ТЕМА 10.1. МЕХАНИЗМЫ ПЕРЕДАЧИ ГОРМОНАЛЬНОГО СИГНАЛА. КЛАССИФИКАЦИЯ ГОРМОНОВ. ГОРМОНЫ ГИПОФИЗА. (СЕМИНАР)

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. Влияние гормонов на клетки осуществляется через особые механизмы, нарушение которых ведет к недостаточности или изменению эффекта гормона. Для правильной оценки причин возникновения гормональных заболеваний необходимо знание механизмов передачи гормонального сигнала в клетку.

Изменение эндокринной регуляции при недостаточном или избыточном синтезе гормонов приводит к нарушениям процессов обмена в организме. В клинике широко используют гормоны и гормональные препараты для лечения эндокринных и неэндокринных заболеваний.

ЦЕЛЬ

Изучение механизмов действия белковых и пептидных гормонов, гормонов производных аминокислот, стероидных гормонов.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Принципы регуляции обменных процессов. Иерархия регуляторных систем организма. Роль гипоталамуса и гипофиза.
2. Механизм обратной отрицательной связи в регуляции образования и действия гормонов.
3. Общие биологические признаки гормонов. Классы гормонов в соответствии с химическим строением, биологическими функциями и принадлежности к эндокринным железам.
4. Характеристика трех мембранных механизмов передачи гормонального сигнала в клетки-мишени:
 - рецептор, обладающий ферментативной активностью (схематично на примере рецептора инсулина),
 - рецептор, образующий ионный канал (схематично на примере рецептора ацетилхолина),
 - передача гормонального сигнала с использованием G-белков (аденилатциклазный, кальций-фосфолипидный механизмы). Укажите компоненты передающей системы,

отметьте роль активирующей и ингибирующей α -субъединицы G-белка. Какие гормоны используют эти механизмы?

5. Гуанилатциклазный механизм передачи сигнала. Общая характеристика этого механизма.
6. Строение и источники вторичных посредников передачи гормонального сигнала: цАМФ, цГМФ, инозитолтрифосфат (ИФ₃), диацилглицерол (ДАГ), ионы Ca²⁺.
7. Характеристика цитозольного механизма передачи гормональных сигналов в клетки-мишени. Гормоны, действующие посредством этого механизма.
8. Гормоны гипоталамуса (либерины и статины).
9. Гормоны – производные проопиомеланокортина.
10. Характеристика гормонов гипофиза (соматотропный гормон, вазопрессин, окситоцин, липотропный гормон, меланоцит-стимулирующий гормон) по плану:
 - название,
 - химическая природа,
 - место синтеза,
 - регуляция синтеза и секреции гормона,
 - органы-мишени,
 - локализация рецепторов в клетке и механизм действия,
 - влияние на обмен углеводов, белков, липидов, минеральных веществ, воды – реакции и ферменты, чувствительные к действию гормона,
 - гипофункция и гиперфункция гормона, их причины и основные клинические проявления.

ТЕМЫ ДЛЯ РЕФЕРАТИВНЫХ СООБЩЕНИЙ

1. Влияние токсинов возбудителей холеры и дифтерии на деятельность аденилатциклазного механизма в пораженной клетке.
2. Механизмы и уровни регуляции функций эндокринных желез, нарушение этих механизмов, последствия.
3. Окситоцин – гормон межчеловеческих взаимоотношений?
4. Гуанилатциклаза, виды, регуляция, способы передачи гормонального сигнала. Гормоны, использующие гуанилатциклазный механизм.
5. Роль оксида азота (NO) в регуляции деятельности клеток в норме и патологии. Участие оксида азота в действии лекарств.
6. Гормонозависимая индукция и репрессия синтеза белка. Особенности рецептора и гормонорецепторного комплекса, их действие. Гормоночувствительный элемент ДНК.

ТЕМА 10.2. ГОРМОНЫ ГИПОТАЛАМУСА, ГИПОФИЗА, ЩИТОВИДНОЙ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ И ПАРАЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗ

АКТУАЛЬНОСТЬ

Гормоны гипоталамуса и гипофиза регулируют рост и функцию других эндокринных желез или оказывают влияние на метаболические реакции в тканях-мишенях. Задняя доля гипофиза секретирует гормоны, регулирующие водный баланс и выброс молока из лактирующей молочной железы. Выпадение функции передней доли гипофиза (пангипопитуитаризм) приводит к атрофии щитовидной железы, коры надпочечников и половых желез.

Гормоны щитовидной железы играют важную роль в регуляции общего метаболизма, развития и дифференцировки тканей. Гормоны, регулирующие гомеостаз кальция, вырабатываются в паращитовидной и щитовидной железах и обеспечивают поддержание концентрации кальция в плазме крови в очень узких пределах.

Гормоны поджелудочной железы инсулин и глюкагон играют первостепенную роль в гомеостазе глюкозы крови, влияя на обмен углеводов и липидов в печени и жировой ткани.

ЦЕЛЬ

Изучение влияния белковых и пептидных гормонов на обмен углеводов, липидов, белков, воды и минеральных веществ.

Приобретение навыков проведения качественных реакций для обнаружения инсулина и тиреоидных гормонов.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Классы гормонов в соответствии с химическим строением, биологическими функциями и принадлежностью к эндокринным железам.
2. Гормоны гипоталамуса (либерины и статины).
3. Характеристика гормонов гипофиза – соматотропный гормон, вазопрессин, окситоцин, адренокортикотропный, липотропный и меланоцитстимулирующий гормоны, лактотропный, фолликуло-стимулирующий и лютеинизирующий гормоны по плану:
 - название,
 - химическая природа,
 - регуляция синтеза и секреции гормона,
 - органы-мишени,
 - локализация рецепторов в клетке и механизм действия,
 - влияние на обмен углеводов, белков, липидов, минеральных веществ, воды – реакции и ферменты, чувствительные к действию гормона,
4. Причины и метаболические последствия гипофункции антидиуретического гормона (несахарный диабет). Какие клиниче-

- ские проявления заболевания отмечаются? В чем проявляется гиперфункция вазопрессина?
5. Характеристика нарушений, связанных с соматотропином: гипофизарный нанизм, акромегалия, гигантизм. Каковы причины и метаболические нарушения? Клинические проявления заболеваний.
 6. Характеристика гормонов тиреоидной функции: тиреолиберин, тиреотропный гормон, три- и тетраiodтиронины. Химическая структура тироксина и трийодтиронина, их органы-мишени, локализация рецепторов в клетке и механизм действия. Влияние на обмен углеводов, белков, липидов. Ферменты, чувствительные к действию гормона. Причины гипо- и гиперфункции щитовидной железы. Метаболические нарушения и клинические проявления заболеваний.
 7. Характеристика кальцитонина и паратгормона по плану:
 - название,
 - химическая природа,
 - регуляция синтеза и секреции гормона,
 - органы-мишени,
 - локализация рецепторов в клетке и механизм действия,
 - влияние на обмен минеральных веществ.
 8. Как эффект кальцитонина и паратгормона сочетается с действием кальцитриола (производное витамина D)?
 9. Характеристика гормонов поджелудочной железы – глюкагона и инсулина по плану:
 - название,
 - химическая природа,
 - регуляция синтеза и секреции гормона,
 - органы-мишени,
 - локализация рецепторов в клетке и механизм действия,
 - влияние на обмен углеводов, белков, липидов – реакции и ферменты, чувствительные к действию гормона.
 10. Типы сахарного диабета. Причины абсолютной и относительной инсулиновой недостаточности. Метаболические нарушения при разных видах сахарного диабета, их клинические проявления, основы лечения.
 11. Проведение качественных реакций на инсулин.
 12. Проведение качественных реакций на тироксин.
 13. Составьте таблицу для гормонов гипофиза, гормонов тиреоидной функции и гормонов паращитовидной и поджелудочной желез по приведенной схеме:

Название и химическая природа	Место синтеза	Регуляция действия гормонов	Органы-мишени	Локализация рецепторов, механизм действия	Влияние на обмен				Гипо- и гиперфункция гормонов
					углеводов	белков	липидов	минеральных веществ и воды	

ТЕМЫ ДЛЯ РЕФЕРАТИВНЫХ СООБЩЕНИЙ

1. Мелатонин, место синтеза, химическая природа, влияние на метаболизм в норме и патологии. Возможность использования мелатонина в клинической практике.
2. Нарушения функции соматотропного гормона. Молекулярные причины. Клинические проявления заболеваний, их диагностика. Основы лечения.
3. Несахарный диабет, его виды. Молекулярные механизмы. Метаболические нарушения. Клинические симптомы. Основы лечения.
4. Причины недостаточности функции щитовидной железы. Симптомы, клинические проявления у детей и взрослых. Основы лечения. Роль гипофункции щитовидной железы в репродуктивном здоровье женщины.

Лабораторная работа 1

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ИНСУЛИН

Принцип

Инсулин является простым белком и дает характерные качественные реакции на белок: биуретовую, ксантопротеиновую, Фоля и др. Эти реакции не специфичны.

Материал исследования

Раствор инсулина.

Реактивы

1) Реактив Фоля, содержащий 5% раствор $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$ и 30% раствор NaOH, 2) 0,5% р-р нингидрина, 3) 30% р-р NaOH, 4) 10% р-р NaOH, 5) 5% р-р $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 6) 5% р-р нитропрусида натрия, 7) конц. HNO_3 , 8) 5% р-р CuSO_4 .

Проведение анализа

В пробирки наливают по 5 капель раствора инсулина и проводят качественные реакции на белок.

Реакция на пептидную связь

Для обнаружения пептидной связи в инсулине используется универсальная **биуретовая реакция**.

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. Интенсивность окрашивания пропорциональна количеству пептидных групп.

Проведение анализа

В пробирку с 5 каплями раствора инсулина вносят 3 капли 10% раствора NaOH и 1 каплю 5% раствора CuSO_4 .

Реакция для обнаружения α -аминогрупп

Для обнаружения α -аминогрупп, содержащихся в аминокислотах, и концевых α -аминогрупп инсулина используется **нингидриновая реакция**.

Принцип

При нагревании белка с нингидрином происходят окислительное отщепление α -аминогрупп и восстановление нингидрина. Восстановленный нингидрин реагирует с аммиаком и другой молекулой окисленного нингидрина с образованием комплекса сине-фиолетового цвета.

Проведение анализа

5 капель раствора инсулина смешивают с 5 каплями 0,5% раствора нингидрина. Пробирки нагревают и кипятят до появления сине-фиолетового окрашивания.

Реакция на ароматические аминокислоты

Для обнаружения ароматических аминокислот (фенилаланин, тирозин, триптофан) используется **ксантопротеиновая реакция**.

Принцип

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

Проведение анализа

К 5 каплям 1% раствора инсулина добавляют 2 капли конц. HNO_3 и осторожно нагревают. Наблюдают за появлением желтого окрашивания, при отсутствии желтого цвета еще добавляют 1-2 капли конц. HNO_3 . При добавлении избытка 30% раствора NaOH окраска переходит в оранжевую.

Реакции на серосодержащие аминокислоты

Принцип

Сульфгидрильные группы в инсулине подвергаются щелочному гидролизу, в результате чего происходит отщепление серы

в виде сульфида натрия Na_2S , который вступает в дальнейшие реакции:

- **реакция Фоля** – Na_2S с ацетатом свинца $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ дает черный или бурый осадок сульфида свинца;
- **реакция с нитропруссидом** – Na_2S дает с нитропруссидом натрия соединение, окрашенное в красно-коричневый цвет.

Проведение анализа

5 капель раствора инсулина и 5 капель 30% раствора NaOH кипятить 1-2 минуты. Разделить содержимое на 2 части для реакций "а" и "б".

а) Реакция Фоля

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

б) Реакция с нитропруссидом

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

Оформление работы

Отмечают принцип методов, регистрируют результаты анализа и делают вывод о наличии инсулина в исследуемом материале.

Лабораторная работа 2

КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ТИРОКСИН

Реактивы

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

Материал исследования

Таблетки тиреоидина.

Проведение анализа

1. Гидролиз тиреоидина (выполняет лаборант):

В ступку помещают 10 таблеток тиреоидина и тщательно растирают. Растертую массу пересыпают в колбу для гидролиза, добавляют 20 мл 10% раствора NaHCO_3 . Колбу с обратным холодильником помещают на асбестовую сетку и содержимое колбы кипятят точно 15 минут (с момента закипания) при умеренном нагревании.

2. Обнаружение йода в гидролизате тиреоидина:

Для обнаружения йода в гидролизате в пробирку наливают 24 капли гидролизата тиреоидина, прибавляют 3 капли 1% раствора крахмала, 1 каплю 0,5% спиртового раствора фенолфталеина, 4 капли 2% раствора KJ и 10-15 капель 10% раствора

H₂SO₄ до прекращения выделения пузырьков углекислого газа и появления синего окрашивания.

Оформление работы

Отмечают принцип методов, регистрируют результаты анализа и делают вывод о наличии тироксина в исследуемом материале.

ТЕМА 10.3. ГОРМОНЫ ГИПОФИЗА, НАДПОЧЕЧНИКОВ И ПОЛОВЫХ ЖЕЛЕЗ

АКТУАЛЬНОСТЬ

В организме кортикотропин и гормоны надпочечников выполняют функции, связанные с деятельностью организма в состоянии острого и хронического напряжения, обеспечивая устойчивость к повреждающим воздействиям среды. Гормоны половой сферы участвуют в поддержании полового поведения и процессах размножения.

В клинике глюкокортикоиды применяют как противовоспалительные и антиаллергические препараты. Половые гормоны и их аналоги используют в онкологической практике, в заместительной гормонотерапии, в гормональной контрацепции.

ЦЕЛЬ

Изучение строения и биологических эффектов гормонов надпочечников и половых желез.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Классы гормонов в соответствии с химическим строением, биологическими функциями и принадлежностью к эндокринным железам.
2. Химическая формула адреналина и норадреналина. Характеристика адреналина по плану:
 - химическая природа,
 - место и химизм реакций синтеза,
 - регуляция синтеза и секреции гормона,
 - органы-мишени,
 - локализация рецепторов в клетке и механизмы действия,
 - влияние на обмен углеводов, белков, липидов – реакции и ферменты, чувствительные к действию гормона,
 - понятие феохромоцитомы, клинические проявления, основы лечения.
3. Типы адренорецепторов и особенности их действия. Биохимические эффекты гормона при стрессовых ситуациях. В чем заключается механизм лечебного действия адреналина при остановке сердца, приступах астмы?

4. Характеристика следующих гормонов: кортиколиберин, кортикотропин (АКТГ), кортизол по плану:
- название,
 - химическая природа и строение,
 - место синтеза, транспорт в крови,
 - регуляция синтеза и секреции гормона,
 - органы-мишени,
 - локализация рецепторов в клетке и механизм действия,
 - влияние на обмен углеводов, белков, липидов, минеральных веществ – реакции и ферменты, чувствительные к действию гормона,
 - гипо- или гиперфункция гормона, метаболические нарушения, клинические проявления.
5. Изменение метаболизма в жировой, мышечной, лимфоидной, эпителиальных тканях при гипо- и гиперкортицизме. Что значит выражение стероидный диабет?
6. Основные этапы синтеза стероидных гормонов. Роль прегненолона и прогестерона – ключевых соединений на пути синтеза. Специфические гидроксилазы, определяющие образование минералокортикоидов и глюкокортикоидов. Роль ароматаз в синтезе эстрогенов.
7. Характеристика минералокортикоидов (альдостерона) по плану:
- химическая природа и строение,
 - место синтеза, транспорт в крови,
 - регуляция синтеза и секреции гормона,
 - органы-мишени,
 - локализация рецепторов в клетке и механизм действия,
 - влияние на обмен минеральных веществ и воды – реакции и ферменты, чувствительные к действию гормона,
 - гипо- или гиперфункция гормона, метаболические нарушения, клинические проявления.
8. Роль ренин-ангиотензиновой системы в регуляции синтеза и секреции альдостерона. Биохимический механизм развития почечной гипертензии.
9. Окситоцин, лактотропный, фолликулостимулирующий и лютеинизирующий гормоны гипофиза, прогестерон и эстрадиол, тестостерон. Их характеристика по плану:
- название,
 - химическая природа и химическая формула (для стероидных гормонов),
 - место синтеза,
 - регуляция синтеза и секреции гормона,
 - органы-мишени, транспорт в крови,
 - локализация рецепторов в клетке и механизм действия,

- влияние на обмен углеводов, белков, липидов, минеральных веществ – биохимические процессы, чувствительные к действию гормонов,
 - гипо- или гиперфункция гормона, метаболические нарушения, клинические проявления.
10. Цикличность изменений концентрации гонадотропных гормонов, прогестерона и эстрогенов в организме женщины (менструальные циклы).
11. Качественные реакции на адреналин.
12. Составьте таблицу для гормонов коры надпочечников и половых гормонов по приведенной схеме:

Название и химическая природа	Место синтеза	Регуляция действия гормонов	Органы-мишени	Локализация рецепторов, механизм действия	Влияние на обмен				Гипо- и гиперфункция гормонов
					углеводов	белков	липидов	минеральных веществ и воды	

ТЕМЫ ДЛЯ РЕФЕРАТИВНЫХ СООБЩЕНИЙ

1. Глюкокортикоиды – лекарственные препараты. Механизм противовоспалительного и антиаллергического действия глюкокортикоидов. Побочные эффекты.
2. Роль глюкокортикоидов в приспособительных реакциях при стрессе, в развитии адаптационного синдрома. Работы Г.Селье, Ф.Меерсона и др.
3. Использование синтетических аналогов эстрогенов и прогестинов для гормональной контрацепции. Ее механизмы. Побочные эффекты.
4. Синтетические аналоги тестостерона в качестве лекарственных препаратов. Использование анаболических стероидов и других гормонов в спортивной медицине. Побочные эффекты.
5. Гормональные изменения в организме женщины при беременности. Влияние гормональных заболеваний матери на развитие плода.

Лабораторная работа 1

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА АДРЕНАЛИН

Реактивы

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

Материал исследования

Раствор адреналина, приготовленный ex tempore.

Качественная реакция с FeCl₃

Принцип

Раствор FeCl₃, реагируя с пирокатехиновым кольцом, входящим в молекулу адреналина, образует продукты зеленого цвета.

Проведение анализа

В пробирку наливают по 10 капель раствора адреналина и добавляют 1 каплю раствора FeCl₃. Наблюдают зеленое окрашивание. После добавления 1 капли 10% раствора NaOH окраска переходит в вишнево-красную.

Флуоресценция продуктов окисления адреналина

Принцип

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

Оборудование

Ртутно-кварцевая лампа.

Проведение анализа

К 10 каплям дистиллированной воды приливают 6 капель 10% раствора NaOH и 2-4 капли раствора адреналина. Поместив пробирку перед ртутно-кварцевой лампой, наблюдают зеленую флуоресценцию продуктов окисления адреналина.

Оформление работы

Отмечают принцип методов, регистрируют результаты анализа и делают вывод о наличии адреналина в образцах.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один правильный ответ.

1. В РЕГУЛЯЦИИ ОБМЕНА ИОНОВ КАЛИЯ, НАТРИЯ И ХЛОРА ПРИНИМАЕТ УЧАСТИЕ ГОРМОН
 - 1) инсулин
 - 2) альдостерон
 - 3) глюкагон
 - 4) адреналин
2. СОДЕРЖАНИЕ КАЛЬЦИЯ И ФОСФОРА В КРОВИ РЕГУЛИРУЮТ ГОРМОНЫ
 - 1) адреналин и глюкагон
 - 2) адреналин и тироксин
 - 3) паратгормон и кальцитонин
 - 4) кальцитонин и соматотропин

3. СИНТЕЗ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ В КОРЕ НАДПОЧЕЧНИКОВ СТИМУЛИРУЕТСЯ
 - 1) кортикотропином
 - 2) кортиколиберином
 - 3) кортизолом
 - 4) кальцитонином
4. ФУНКЦИЕЙ ИНСУЛИНА ЯВЛЯЕТСЯ
 - 1) стимуляция липолиза
 - 2) активация гликогенолиза
 - 3) увеличение гликемии
 - 4) усиление липогенеза
5. ФУНКЦИЕЙ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ ЯВЛЯЕТСЯ
 - 1) усиление глюконеогенеза
 - 2) увеличение синтеза белков
 - 3) стимуляция захвата глюкозы тканями
 - 4) активация гликолиза
6. ГОРМОНЫ ГИПОТАЛАМУСА ОКАЗЫВАЮТ ПРЯМОЕ ДЕЙСТВИЕ НА
 - 1) щитовидную железу
 - 2) поджелудочную железу
 - 3) гипофиз
 - 4) надпочечники
7. ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗ УСИЛИВАЕТ ГОРМОН
 - 1) альдостерон
 - 2) инсулин
 - 3) кортизол
 - 4) тестостерон
8. ЭФФЕКТ КАЛЬЦИТОНИНА ЗАКЛЮЧАЕТСЯ В
 - 1) снижении уровня ионов Ca^{2+} в крови
 - 2) повышении уровня ионов Ca^{2+} в крови
 - 3) повышении уровня ионов K^+ в крови
 - 4) снижении уровня ионов K^+ в крови
9. ПРИ ПОВЫШЕНИИ КОНЦЕНТРАЦИИ СОМАТОТРОПИНА РАЗВИВАЕТСЯ
 - 1) акромегалия
 - 2) синдром Иценко-Кушинга
 - 3) Базедова болезнь
 - 4) сахарный диабет
10. ПАРАТГОРМОН РЕГУЛИРУЕТ ОБМЕН ИОНОВ КАЛЬЦИЯ И ФОСФАТОВ, ОКАЗЫВАЯ ДЕЙСТВИЕ НА
 - 1) почки и костную ткань
 - 2) поджелудочную железу и кишечник
 - 3) печень и мышцы
 - 4) жировую и костную ткань

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 содержание холестерина снижено.

Об изменении функции какой железы можно думать? В чем причина таких симптомов?

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

Для какого заболевания характерны эти симптомы? Какие лабораторные исследования необходимо провести 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.

О недостаточности каких гормонов можно думать?

РАЗДЕЛ 11. БИОХИМИЯ КРОВИ

ТЕМА 11.1. АЗОТСОДЕРЖАЩИЕ ВЕЩЕСТВА КРОВИ: БЕЛКИ, ФЕРМЕНТЫ, ФРАКЦИИ ОСТАТОЧНОГО АЗОТА

АКТУАЛЬНОСТЬ

Существует тесная взаимосвязь крови со всеми тканями организма. Исследование различных по происхождению азотсодержащих компонентов крови и их роли в обмене веществ позволяет диагностировать нарушения метаболизма в организме, следить за развитием патологического процесса и оценивать эффективность терапевтических мероприятий. Соотношение азотсодержащих соединений в крови меняется в зависимости от образа жизни и возраста человека.

ЦЕЛЬ

Изучение происхождения и клинико-диагностического значения определения азотсодержащих веществ крови.

Приобретение навыков определения азотсодержащих веществ крови: белки, фракции белков, компоненты остаточного азота.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Органические и неорганические компоненты крови. Форменные элементы, плазма, сыворотка крови.
2. Источники глюкозы, триацилглицеролов и холестерина крови. Клинико-диагностическое значение определения их концентрации в крови.
3. Азотсодержащие вещества крови.
4. Понятие общего белка крови. Физиологические функции белков крови, нормальные показатели концентрации общего белка крови. Причины гипо- и гиперпротеинемий.
5. Основные белковые фракции сыворотки крови. Нормальные величины их концентрации в крови. Приведите 1-3 примера белков для каждой фракции (см. Приложение 2). Диспротеинемии и парапротеинемии. Возрастная динамика белковых фракций. Эмбриоспецифические белки и их диагностическое значение.
6. Понятие протеинограммы. Изменение соотношения белковых фракций при остром и хроническом воспалении, при патологии почек, при опухолевых заболеваниях, при патологиях печени.
7. Основные ферменты плазмы и сыворотки крови. В чем заключается энзимодиагностика? Истинно плазменные (плазмоспецифичные) ферменты. Две группы органоспецифичных

- ферментов: индикаторные (клеточного метаболизма) и экскреторные (секретируемые) ферменты.
8. Остаточный азот крови. Перечислите его компоненты и их количественный состав. Укажите причины и виды гиперазотемий.
 9. Реакции синтеза креатина и креатинина. Нормальные величины концентрации в крови. Клинико-диагностическое значение определения концентрации креатинина в крови и моче.
 10. Реакции синтеза мочевины. Нормальные величины ее концентрации в крови. Клинико-диагностическое значение определения концентрации мочевины в крови и моче.
 11. Реакции синтеза мочевой кислоты. Нормальные величины концентрации в крови. Клинико-диагностическое значение определения концентрации мочевой кислоты в крови и моче.
 12. Гипераммониемии, их причины и последствия. Нормальный и предельно допустимый уровни концентрации аммиака в крови. Причины токсичности аммиака.
 13. Определение общего количества остаточного азота в сыворотке крови. Нормальные показатели и клинико-диагностическое значение.
 14. Методы количественного определения общего белка сыворотки крови, их принцип. Нормальные показатели и клинико-диагностическое значение.
 15. Пробы на коллоидоустойчивость белков сыворотки крови. Принцип тимоловой пробы и пробы Вельтмана. Нормальные показатели и клинико-диагностическое значение.
 16. Белковые фракции сыворотки крови. Принцип электрофореза. Нормальные показатели и клинико-диагностическое значение.
 17. Используя приложение 2, составьте в тетради таблицу индивидуальных глобулинов крови с указанием их функции:

α_1 -глобулины	α_2 -глобулины	β -глобулины	γ -глобулины

ТЕМЫ ДЛЯ РЕФЕРАТИВНЫХ СООБЩЕНИЙ

1. Возрастная динамика белковых фракций. Эмбриоспецифические белки и их диагностическое значение.
2. Остаточный азот: его основные компоненты. Динамика уровня фракций остаточного азота в постнатальный период.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ОСТАТОЧНОГО АЗОТА КРОВИ ПО МЕТОДУ АСЕЛЯ

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%). Так как показатель включает различные низкомолекулярные азотсодержащие вещества, более информативным является определение отдельных фракций остаточного азота.

Принцип

Сжигание небелкового фильтрата с концентрированной серной кислотой дает переход азота органических веществ в сульфат аммония, который с реактивом Несслера образует продукты желто-оранжевого цвета. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации азота.

Материал исследования

Сыворотка крови.

Реактивы

1) Реактив Несслера (щелочной раствор йодистых солей ртути и калия), 2) 5% р-р NaOH, 3) лакмусовая бумага.

Стандартный раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 26 ммоль/л.

Оборудование

Колбы Кьельдаля, песчаная баня, фотоэлектроколориметр.

Проведение анализа

1. Подготовительный этап (выполняет лаборант):

Осаждение белков: в центрифужную пробирку, содержащую 1,8 мл дистиллированной воды, вносят 0,2 мл сыворотки крови, приливают 1,0 мл 10% раствора ТХУ, центрифугируют или фильтруют через смоченный бумажный фильтр.

Для минерализации 1,0 мл надосадка переносят в термостойкую пробирку, приливают 3 капли концентрированной H_2SO_4 и 3 капли H_2O_2 . Осторожно упаривают и нагревают до получения бесцветного минерализата.

2. Цветная реакция

	Опыт, мл	Стандарт, мл
Минерализат	1,0	—
Стандартный раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	—	1,0
Раствор NaOH	Проверяя величину pH по лакмусовой бумажке, добавляют по каплям до тех пор, пока pH не станет нейтральной – в нейтральной среде лакмус синее. N.B. Излишек щелочи вызывает помутнение раствора	

Дистил. вода	8,0	8,0
Реактив Несслера	2,0	2,0
	Измеряют оптическую плотность опытной и стандартной проб против воды при 540 нм (зеленый светофильтр)	

Расчет

Концентрация остаточного азота, ммоль/л = $\frac{E_{оп}}{E_{ст}} \times C_{ст}$, где

$E_{оп}$ и $E_{ст}$ – оптическая плотность опытной и стандартной проб,
 $C_{ст}$ – концентрация стандартного раствора

Клинико-диагностическое значение

Остаточный азот является показателем состояния белкового обмена.

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

- ретенционная азотемия возникает в результате задержки выведения азотсодержащих веществ и различается на азотемию **почечного** происхождения (заболевания клубочков – нефриты, туберкулез почек, нефросклероз и др.) и **внепочечного** происхождения. Внепочечные гиперазотемии подразделяются 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.

Уменьшение концентрации остаточного азота возникает при снижении содержания мочевины, аминокислот или других фракций.

Оформление работы

Записывают принцип методов и результаты анализа, отмечают клинико-диагностическое значение. Делают вывод о практическом значении метода и о возможных патологиях.

Лабораторная работа 2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ОБЩЕГО БЕЛКА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Биуретовый метод

Принцип

Пептидная связь в щелочной среде образует с медью комплексное соединение (биуретовая реакция). Интенсивность развивающегося сине-фиолетового окрашивания пропорциональна содержанию белка.

Материал исследования

Сыворотка крови.

Реактивы

1) Биуретовый реактив: смесь р-ра CuSO_4 и р-ра NaOH ; 2) 0,9% р-р NaCl .

Стандартный раствор альбумина, 70 г/л.

Проведение анализа

	Опыт, мл	Стандарт, мл
Сыворотка крови	0,04	—
Стандартный р-р альбумина	—	0,04
Биуретовый реактив	3,0	3,0
Инкубируют 10 минут и измеряют оптическую плотность опытной и стандартной проб против воды при длине волны 540 нм (зеленый светофильтр)		

Расчет

Концентрация общего белка сыворотки, г/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 белка в стандартной пробе.

Нормальные величины

Сыворотка крови	дети от 1 года до 3 лет	54-85 г/л
	старшие дети и взрослые	65-85 г/л

Рефрактометрический метод

Принцип

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

зависят от объема крови, то есть наблюдаются при обезвоживании или гипергидратации.

Гиперпротеинемия

Истинное повышение концентрации белка в крови чаще всего связано с увеличением фракции глобулинов. Встречается при острых инфекциях (увеличение синтеза белков острой фазы), при хронических инфекциях (за счет γ -глобулинемии), при миеломной болезни, лимфогрануломатозе, саркоидозе.

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

Гипопротеинемия

Снижение концентрации белка в крови чаще всего связано с уменьшением фракции альбуминов крови.

Истинная (абсолютная) гипопротеинемия связана:

- с недостаточным потреблением белка с пищей – заболевания желудочно-кишечного тракта, сужение пищевода при опухолях, частичное или полное голодание;
- со снижением синтеза белка – несбалансированный аминокислотный состав пищи, хронические паренхиматозные гепатиты, интоксикации, злокачественные новообразования, лечение кортикостероидами;
- с усиленным распадом белка – кахексия, тяжелые инфекции, длительные воспалительные процессы, лихорадочные состояния, тиреотоксикозы;
- с потерей белка – нарушения проницаемости капиллярных стенок, кровоизлияния, ожоги, острые и хронические кровотечения, нефротический синдром.

Относительная гипопротеинемия связана с нарушением водного баланса – гипергидратация при гиперальдостеронизме, при почечной недостаточности со снижением экскреции солей, при использовании для питья морской воды, при неадекватных инфузиях солевых растворов.

Оформление работы

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

ПРОВЕДЕНИЕ ПРОБ НА КОЛЛОИДОУСТОЙЧИВОСТЬ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ

Устойчивость белков сыворотки крови зависит от их заряда и наличия гидратной оболочки. Нарушение коллоидной устойчивости белков под влиянием различных агентов проявляется сначала склеиванием (коагуляцией) белковых молекул, а затем выпадением их в осадок. При этом в первую очередь осаждаются более крупные и менее заряженные белки – глобулины.

Осадочная проба Вельтмана в модификации Тайфля

Принцип

При добавлении к сыворотке крови раствора CaCl_2 снижается коллоидная устойчивость белков вследствие уменьшения электрического заряда частиц при действии электролита. Вследствие этого при нагревании первыми выпадают в осадок γ -глобулины (иммуноглобулины).

Реактивы

0,5% р-р CaCl_2 .

Материал исследования

Сыворотка крови.

Проведение анализа

В химическую пробирку добавляют 0,1 мл сыворотки, 4,9 мл дистиллированной воды и 0,1 мл 0,5% раствора CaCl_2 . Встряхивают, нагревают в кипящей водяной бане или на спиртовке до однократного закипания и охлаждают.

Если хлопья в пробирке не обнаруживаются, то в нее добавляют еще 0,1 мл 0,5% раствора CaCl_2 и раствор вновь нагревают до кипения. Процедуру повторяют до выпадения хлопьевидного осадка. Учитывают объем 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 сывороточных α - и β -глобулинов					Сдвиг вправо. Обусловлен повышением содержания γ -глобулинов				

<i>Клинико-диагностическое значение</i>	Ревматизм, активный туберкулез, перитонит, нефроз, острые инфекции, опухоли, сахарный диабет		Фиброзы, гемолиз, повреждения печени (гепатит, цирроз, дистрофия), пневмония, плеврит, туберкулез, остеомиелит
---	--	--	--

Нормальные величины

Сыворотка крови 0,4-0,5 мл р-ра CaCl₂

Тимоловая проба

Как и все коагуляционные тесты, тимоловая проба является неспецифической реакцией. Вместе с тем она более приемлема для функционального исследования печени, чем другие коллоидные пробы.

Принцип

Сывороточные β-, γ-глобулины и липопротеины осаждаются при pH 7,55 тимоловым реактивом вследствие образования глобулин-тимол-липидного комплекса.

Реактивы

Тимоловый буфер, pH 7,55-7,60.

Материал исследования

Сыворотка крови.

Проведение анализа

	Опыт, мл
Сыворотка крови	0,05
Тимоловый буфер	3,0
	Перемешивают и оставляют стоять 15 минут при комнатной температуре. Снова перемешивают и сравнивают с калибровочными пробами. Результат выражают в единицах помутнения S-H (по авторам: Shank-Haagland)

Калибровочная шкала

В качестве калибровочных проб используются растворы с различной интенсивностью мутности. Перед использованием пробы необходимо тщательно перемешать.

N пробы	Единицы помутнения, S-H
1	5
2	10
3	15
4	20

Нормальные величины

Сыворотка крови 0-4 ед.S-H

Клинико-диагностическое значение

Проба применяется для дифференциальной диагностики заболеваний печени. При поражении паренхимы печени (инфекционный и токсический гепатит) уже в преджелтушной стадии или при безжелтушной форме в 90-100% случаев тимоловая проба выше нормальных величин. У здоровых индивидов, при остальных заболеваниях печени или нарушении функции других органов тимоловая проба соответствует норме.

Оформление работы

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

Лабораторная работа 4 (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, находящаяся в зависимости от следующих факторов:

- заряд (обычно зависит от рН), размеры и форма молекул веществ;
- 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);
- буферный раствор – состав, концентрация, рН и ионная сила (зависит от концентрации ионов и их заряда);
- носитель – учитывается его гидрофильность, адсорбция веществ на молекулах носителя.

Материал исследования

Сыворотка крови.

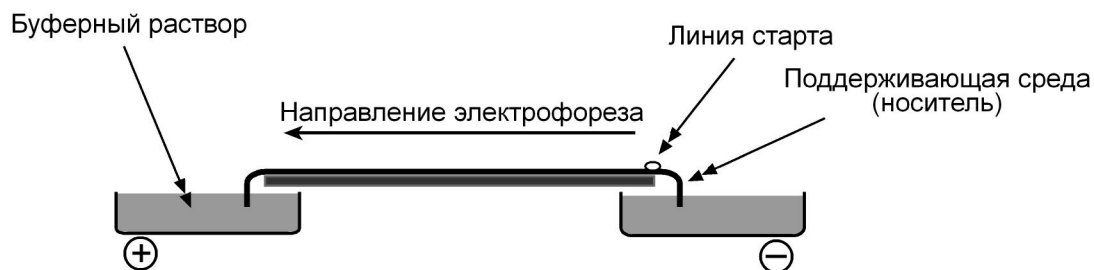
Оборудование

Прибор для электрофореза, денситометр.

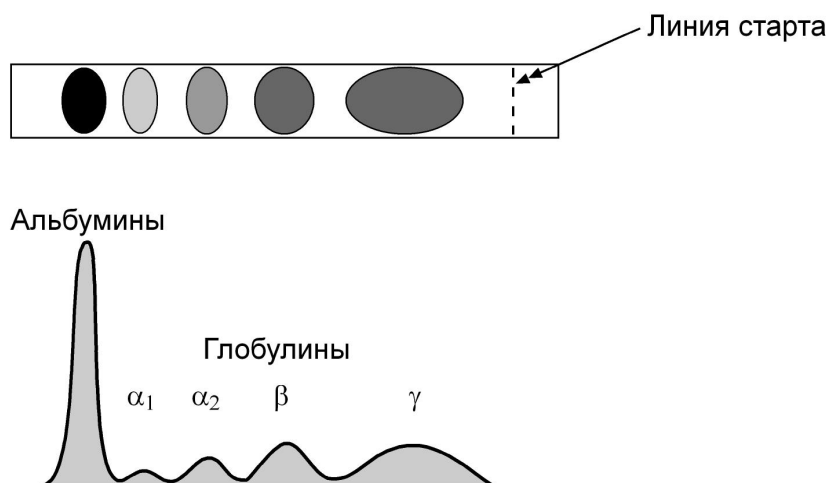
Проведение анализа (основные положения)

Образцы сыворотки равномерно наносят по линии старта на носитель (бумага, ацетатцеллюлозная пленка). Носитель помещают в прибор для электрофореза и подают электрический ток. Буферный раствор, двигаясь в электрическом поле, захватывает молекулы белка. Молекулы с наибольшим отрицательным заря-

дом и наименьшим размером, т.е. альбумины, двигаются быстрее остальных. Наиболее крупные и нейтральные (γ -глобулины) оказываются последними. Через некоторое время (устанавливается для каждого прибора индивидуально) электрофорез заканчивают.



Полоски бумаги или ацетатцеллюлозной пленки отмывают от буферного раствора и окрашивают. В результате участки, содержащие белок, прокрашиваются, при этом площадь и интенсивность окраски зависят от содержания белковой фракции. В настоящее время количественный учет окрашенных зон на электрофореграмме проводят при помощи денситометра. Работа денситометра основана на пропускании луча света через движущуюся полосу носителя. При изменении интенсивности окраски носителя происходит "всплеск" и регистрируется наличие окрашенной зоны (белковой фракции). Параллельно современные приборы автоматически рассчитывают процентное соотношение белковых фракций.



Клинико-диагностическое значение Альбумины

Снижение содержания альбуминовой фракции происходит при состояниях, характеризующихся:

- пониженным синтезом альбуминов – при врожденной анальбуминемии, белковом голодании, нарушении всасывания, тяжелых поражениях печени (цирроз, дистрофии, некроз, активный гепатит, амилоидоз печени);
- повышенным катаболизмом альбуминов – при лихорадке, кахексии, тяжелых инфекциях, панкреатите, коллагенозах, тиреотоксикозе, болезни Иценко-Кушинга (гипофункция надпочечников);
- потерей альбумина через ожоговые поверхности, почки, желудочно-кишечный тракт;
- воспалительными процессами, обусловленные выходом альбумина из кровотока в межклеточное пространство.

Концентрация альбумина <20 г/л сопровождается отеками.

α-Глобулины

Повышение содержания α_1 - и α_2 -глобулиновой фракции связано с острыми и подострыми воспалительными процессами и некоторыми злокачественными опухолями, травмами, так как сюда входит большинство белков острой фазы (С-реактивный белок, α_2 -макроглобулин, α_1 -гликопротеин, α_1 -антитрипсин, церулоплазмин, гаптоглобин).

β-Глобулины

Большая доля белков β-глобулиновой фракции является β-липопротеинами (ЛПОНП и ЛПНП), поэтому повышение этой фракции чаще всего связано с гиперлипопротеинемиями. Кроме того, влияние на динамику этой фракции оказывают трансферрин, гемопексин, компоненты системы комплемента.

γ-Глобулины

Содержание γ-глобулинов увеличивается при патологических состояниях, связанных с хроническими воспалительными процессами, так как класс содержит иммуноглобулины G, A и M.

ТЕМА 11.2. ОБМЕН ЖЕЛЕЗА. ГЕМОПРОТЕИНЫ. СИНТЕЗ И РАСПАД ГЕМА

АКТУАЛЬНОСТЬ

Широкое разнообразие биологически важных функций гемоглобина и других гемопротеинов (например, цитохромов) вызывает необходимость изучения строения и роли этих белков в метаболизме. Состояния, связанные с нарушением синтеза и распада гема, приводят к развитию заболеваний крови и печени.

ЦЕЛЬ

Изучение реакций синтеза и распада гема, метаболизма билирубина.

Освоение методов определения концентрации основных показателей пигментного обмена – гемоглобина в крови, билирубина в сыворотке крови, 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. Функция указанных эритроцитарных белков – спектрин, гликофорин, белок полосы 3.
3. Особенности окисления глюкозы в эритроците. Как осуществляется обезвреживание активных форм кислорода?
4. Строение гема, реакции и основные этапы его синтеза. Регуляция синтеза гема и гемоглобина.
5. Причины порфирий, их клинические проявления, основы лечения порфирий.
6. Талассемии, их виды и причины.
7. Строение наиболее представленных в организме гемсодержащих белков (гемоглобин, миоглобин, цитохромы, каталаза, пероксидаза). Их функция и локализация.
8. Патологические и физиологические типы гемоглобина (метгемоглобин, серповидно-клеточный, гликозилированный гемоглобин, карбоксигемоглобин, оксигенированный гемоглобин, карбогемоглобин). Значение определения концентрации гликозилированного гемоглобина, оксигемоглобина и карбогемоглобина.
9. Схема реакций, происходящих в эритроците в капиллярах легких и тканей.
10. Механизмы транспорта углекислого газа. В каком виде переносится углекислый газ? Как он связывается с гемоглобином? Роль карбоангидразы. Роль эритроцита в изменении концентрации бикарбонат-ионов плазмы.
11. Связывание гемоглобина с кислородом. Нормальная степень насыщения гемоглобина кислородом. Механизм транспорта кислорода. Влияние температуры, величины рН, концентрации CO_2 на сродство гемоглобина к кислороду, регуляция процесса. Кооперативность протомеров, эффект Бора, роль 2,3-дифосфоглицерата.
12. Кривые насыщения гемоглобина кислородом или диссоциации гемоглобина. Чем объясняется S-образный характер кривой диссоциации гемоглобина?
13. Реакции распада гемоглобина и гема в ретикулоэндотелиальной системе.
14. Непрямой (свободный) билирубин, его строение, реакции образования. Дальнейшая судьба непрямого билирубина.

14. Прямой (связанный) билирубин, его строение, реакции образования, его дальнейшая судьба. Роль фермента УДФ-глюкуронилтрансферазы. Как выводятся конечные продукты распада гема?
15. Состояния, связанные с избыточным распадом гемоглобина. Причины гемолитической желтухи и ее лабораторные критерии.
16. Состояния, связанные с нарушениями оттока желчи. Причины обтурационной желтухи и ее лабораторные критерии.
17. Состояния, связанные с недостаточностью функции гепатоцитов. Причины паренхиматозной желтухи и ее лабораторные критерии.
18. Физиологические желтухи новорожденных.
19. Патологические желтухи новорожденных:
 - гемолитические желтухи, их причины. Физиологические основы применения фенобарбитала;
 - наследственные нарушения выведения билирубина – синдромы Жильбера-Мейленграхта, Дубина-Джонсона, Криглера-Найара;
 - представление о приобретенных нарушениях выведения билирубина – избыток эстрогенов молока, инфекционные и токсические причины;
 - представление о механических желтухах вследствие муковисцидоза, болезни Нимана-Пика, гипоплазии желчных путей.
20. Определение концентрации гемоглобина в крови гемоглобинцианидным методом. Принцип метода, нормальные величины, клинико-диагностическое значение.
21. Определение содержания общего билирубина и его фракций в сыворотке крови. Принцип метода, нормальные величины, клинико-диагностическое значение.
22. Обнаружение билирубина и желчных пигментов в моче. Принцип методов, нормальные величины, клинико-диагностическое значение.

ТЕМЫ ДЛЯ РЕФЕРАТИВНЫХ СООБЩЕНИЙ

1. Железодефицитные состояния, их причины. Диагностика. Последствия. Лечение.
2. Врожденные и приобретенные метгемоглобинемии. Причины. Недостаточность НАДН-метгемоглобинредуктазы. Клинические проявления.
3. Порфирии. Классификация, причины, патогенез, клинические проявления, основы лечения.

Лабораторная работа 1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ГЕМОГЛОБИНА В КРОВИ ГЕМОГЛОБИНЦИАНИДНЫМ МЕТОДОМ

Принцип

Гемоглобин при взаимодействии с гексацианоферратом калия (красная кровяная соль) окисляется в метгемоглобин, образующий с ацетонциангидрином окрашенный гемоглобинцианид, интенсивность окраски которого пропорциональна количеству гемоглобина.

Реактивы

Трансформирующий реактив (смесь ацетонциангидрина, Na₂CO₃, гексацианоферрата калия K₃[Fe(CN)₆]).

Стандартный раствор гемоглобинцианида, 150 г/л.

Материал исследования

Свежая кровь животных.

Проведение анализа

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

Расчет

$$\text{Концентрация гемоглобина, г/л} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}}, \text{ где}$$

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

Нормальные величины

Свежая кровь	дети	100-140 г/л
	женщины	120-140 г/л
	мужчины	130-160 г/л

Клинико-диагностическое значение

Снижение концентрации гемоглобина наблюдается при анемиях – железодефицитной (до 60 г/л), геморрагической, гипопластической, гемолитической, В₁₂-дефицитной.

Увеличение концентрации гемоглобина наблюдается при миелопролиферативных заболеваниях – эритремии (до 210 г/л),

симптоматических эритроцитозах – пролиферации элементов эритропоэза, при обезвоживании.

Лабораторная работа 2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ОБЩЕГО БИЛИРУБИНА И ЕГО ФРАКЦИЙ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Принцип

Взаимодействие сульфаниловой кислоты с азотистым натрием дает диазофенилсульфовую кислоту, которая с билирубином образует окрашенные азопигменты (диазореакция Эрлиха). Связанный (прямой) билирубин реагирует быстро, поэтому о его концентрации судят по первоначальной интенсивности окраски. Несвязанный билирубин вступает в реакцию только после добавления акселератора (кофеин). Последний освобождает билирубин из комплекса с белками и тем самым ускоряет реакцию азосочетания.

Материал исследования

Сыворотка крови.

Реактивы

1) Сульфаниловая кислота в HCl (реагент 1), 2) натрий азотисто-кислый NaNO₂ (реагент 2), 3) кофеиновый реактив (реагент 3), 4) буферный раствор (реагент 4), 5) 0,9% р-р NaCl, 6) раствор альбумина, 20 г/л.

Стандартный раствор билирубина, 5 мкмоль/л.

Проведение анализа

	Общий билирубин, мл	Прямой билирубин, мл	Стандарт, мл	Контроль, мл
Сульфаниловая кислота (реагент 1)	0,2	0,2	0,2	—
NaNO ₂ (реагент 2)	1 капля	1 капля	1 капля	—
Кофеиновый реактив (реагент 3)	1,0	—	1,0	1,0
NaCl	—	1,0	—	0,2
Сыворотка крови	0,2	0,2	—	0,2
Стандартный р-р билирубина	—	—	0,2	—
Перемешивают и оставляют на 10 минут				
Буферный раствор (реагент 4)	1,0	1,0	1,0	1,0

	<p>Измеряют оптическую плотность пробы на прямой билирубин против контроля при длине волны 540 нм (зеленый светофильтр).</p> <p>Еще через 10 минут измеряют оптическую плотность пробы на общий билирубин против контроля при длине волны 540 нм (зеленый светофильтр).</p>
--	---

Расчет

По формуле рассчитывают концентрацию общего и прямого билирубина, концентрацию непрямого билирубина находят как разность между концентрацией общего и прямого билирубина.

$$\text{Концентрация билирубина, мкмоль/л} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}}, \text{ где}$$

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

Нормальные величины

Сыворотка крови

Общий билирубин

Дети	3,4-17,1 мкмоль/л
Взрослые	8,5-20,5 мкмоль/л

Прямой билирубин

Дети	отсутствие
Взрослые	2,2-5,1 мкмоль/л

Клинико-диагностическое значение

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

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

Сыворотка крови:

Накопление билирубина в крови свыше 43 мкмоль/л ведет к связыванию его эластическими волокнами кожи и конъюнктивы,

что проявляется в виде желтухи. Для дифференциальной диагностики желтух необходимо определить, за счет какой фракции возникает билирубинемия:

1. **Гемолитическая** (надпеченочная) желтуха – ускоренное образование билирубина в результате гемолиза. *Гипербилирубинемия* развивается за счет фракции непрямого билирубина. В моче резко возрастает содержание уробилина, билирубин отсутствует. В кале увеличено содержание стеркобилина.

Данный тип желтух может развиваться при В₁₂-дефицитной анемии, гемолитических анемиях различного происхождения (порфирии, лекарства, несовместимость крови, дефект глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы).

2. **Паренхиматозная** (печеночно-клеточная) желтуха – нарушено извлечение билирубина печеночными клетками, его конъюгирование и выведение. *Гипербилирубинемия* развивается за счет обеих фракций: количество непрямого билирубина возрастает за счет функциональной недостаточности гепатоцитов или снижения их количества, а прямого – за счет цитолиза гепатоцитов. В моче определяется билирубин, умеренно увеличена концентрация уробилина, уровень стеркобилина кала в норме или снижен.

Наблюдается при вирусных и других формах гепатитов, циррозе и опухолях печени, жировой дистрофии, при других состояниях.

3. **Механическая** (подпеченочная) желтуха развивается вследствие нарушения оттока желчи при закупорке желчного протока. В результате застоя желчи происходит растяжение желчных капилляров, увеличивается их проницаемость. Не имеющий оттока в желчь прямой билирубин поступает в кровь и в результате развивается гипербилирубинемия. В тяжелых случаях, вследствие переполнения гепатоцитов прямым билирубином, конъюгация с глюкуроновой кислотой нарушается и в крови увеличивается количество несвязанного билирубина. В моче резко увеличен уровень билирубина, практически отсутствует стеркобилин кала.

Кроме желчно-каменной болезни, подпеченочные желтухи выявляются при новообразованиях поджелудочной железы и гельминтозах.

Оформление работы

Записывают принцип метода, ход работы и результаты исследования, отмечают клинико-диагностическое значение, делают вывод о возможной патологии.

ОБНАРУЖЕНИЕ ЖЕЛЧНЫХ ПИГМЕНТОВ В МОЧЕ

Материал исследования

Нормальная моча и моча с желчью.

Реактивы

1) 1% спиртовой р-р йода, 2) конц. HNO_3 , 3) конц. H_2SO_4 , 4) сухой порошок аммония молибдата.

Проба с молибдатом аммония

Принцип

Метод основан на способности желчных пигментов билирубина и биливердина легко окисляться молибдатом аммония в присутствии серной кислоты с образованием билицианина, имеющего синюю окраску.

Проведение анализа

На предметное стекло отдельно наносят каплю мочи с желчью, соль аммония молибдата и каплю концентрированной серной кислоты. Стеклопалочкой все хорошо смешивают. В присутствии билирубина развивается синее окрашивание.

Проба Розина

Принцип

Под действием йода билирубин мочи окисляется в биливердин (зеленого цвета).

Проведение анализа

Берут две пробирку, в одну пробирку наливают 2 мл нормальной мочи, в другую – 2 мл патологической мочи (с желчью). В обе пробирки на мочу наслаивают раствор йода. При наличии билирубина на границе между жидкостями образуется зеленое кольцо.

Нормальные величины

Моча отсутствие

Проба Гмелина

Принцип

Под действием азотной кислоты, содержащей примесь азотистой, билирубин мочи окисляется в биливердин (зеленого цвета), билицианин (сине-фиолетовый), холетелин (желтый).

Проведение анализа

В пробирку с 5-10 каплями концентрированной HNO_3 осторожно, по стенке наслаивают равный объем исследуемой мочи. При наличии в моче желчных пигментов на границе жидкостей появляются цветные кольца. Первым появляется зеленое кольцо биливердина.

Нормальные величины

Моча отсутствие

Проба Розенбаха

Принцип

Принцип метода аналогичен пробе Гмелина.

Проведение анализа

Фильтруют 1-2 мл исследуемой мочи через небольшой фильтр. Желчные пигменты, если они присутствуют в моче, частично задерживаются на фильтре. Затем в конус фильтра вносят 1 каплю концентрированной азотной HNO_3 , содержащей следы азотистой кислоты (HNO_2), и наблюдают на фильтре появление окрашенных колец, как в пробе Гмелина.

Нормальные величины

Моча отсутствие

Клинико-диагностическое значение

Моча

Билирубинурия характерна для обтурационной и паренхиматозной желтух при повышении уровня прямого билирубина в сыворотке, но отсутствует при гемолитической. При гепатите билирубин может быть обнаружен в моче до появления желтухи.

Оформление работы

Записывают принцип методов, результаты исследования заносят в таблицу, отмечают клинико-диагностическое значение, делают вывод о возможной патологии.

Название метода	Материал исследования		Результаты реакции
Проба с молибдатом аммония	моча	нормальная	
		с желчью	
Проба Розина	моча	нормальная	
		с желчью	
Проба Гмелина	моча	нормальная	
		с желчью	
Проба Розенбаха	моча	нормальная	
		с желчью	

ТЕМА 11.3. НЕОРГАНИЧЕСКИЕ ВЕЩЕСТВА КРОВИ. КИСЛОТНО-ОСНОВНОЕ СОСТОЯНИЕ

АКТУАЛЬНОСТЬ

Кровь занимает особое место в метаболизме благодаря ряду специфических функций, принадлежащих ее химическим компонентам. Незаменима роль крови в газообмене и регуляции

кислотно-основного состояния организма, нарушения которых часто встречаются в клинической практике.

ЦЕЛЬ

Изучение кислотно-основного состояния крови и механизмов ее обеспечения.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Электролиты плазмы крови:
 - макроэлементы: натрий, калий, кальций, фосфор, железо, хлор. Каково их распределение и значение в организме? Укажите нормальные концентрации в плазме крови. От каких факторов зависит их концентрация в плазме крови?
 - микроэлементы: йод, медь, цинк, кобальт, селен. Назовите примеры участия этих элементов в обмене веществ.
2. Механизм транспорта углекислого газа. В каком виде переносится углекислый газ? Роль карбоангидразы. Роль эритроцита в изменении концентрации бикарбонат-ионов плазмы.
3. Механизм транспорта кислорода. Как кислород связывается с гемоглобином? Кривая насыщения гемоглобина кислородом или диссоциации гемоглобина.
4. Схема реакций, происходящих в эритроците в капиллярах легких и капиллярах тканей.
5. Показатели кислотно-основного состояния. Их нормальные величины (см. Приложение 3).
6. Химические механизмы регуляции кислотно-основного состояния. Каким образом работают буферные системы крови – фосфатная, белковая, бикарбонатная, гемоглобиновая? Химические реакции.
7. Характеристика физиологических систем компенсации нарушения кислотно-основного состояния – роль легких, почек, печени и костной ткани. Каким образом они работают?
8. Влияние секреции желудка и поджелудочной железы на кислотно-основное состояние организма. Роль печени.
9. 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.
10. Причины сдвигов кислотно-основного равновесия при нижеперечисленных состояниях, способы их химической и физиологической компенсации:

- сахарный диабет,
 - пневмония,
 - тканевая гипоксия,
 - отравление этанолом,
 - неукротимая рвота,
 - диарея,
 - приступ бронхиальной астмы,
 - хронический бронхит,
 - хроническая почечная недостаточность (снижение функции почек),
 - черепно-мозговая травма с возбуждением дыхательного центра,
 - подъем высоко в горы,
 - правожелудочковая сердечная недостаточность.
11. Определение буферной емкости крови. Принцип метода. Клинико-диагностическое значение и нормальные показатели.
 12. Определение рН мочи. Клинико-диагностическое значение и нормальные показатели.
 13. Принцип количественного определения содержания ионов фосфора в сыворотке крови и моче. Клинико-диагностическое значение и нормальные показатели.
 14. Изучение содержания ионов кальция в сыворотке крови и моче. Принцип метода. Клинико-диагностическое значение и нормальные показатели.
 15. Определение концентрации ионов хлора в сыворотке крови и моче. Клинико-диагностическое значение и нормальные величины.

ТЕМЫ ДЛЯ РЕФЕРАТИВНЫХ СООБЩЕНИЙ

1. Сочетанные нарушения кислотно-основного состояния. Методы определения показателей КОС в клинико-лабораторной практике.

Лабораторная работа 1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БУФЕРНОЙ ЕМКОСТИ СЫВОРОТКИ КРОВИ ТИТРОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Сила буферных систем определяется их буферной емкостью, т.е. количеством молей кислоты или основания, которое необходимо добавить к буферному раствору, чтобы сместить его активную реакцию на единицу.

Принцип

Для определения буферной емкости сыворотки в отношении кислых продуктов ее титруют кислотой с индикатором метилоранж.

Для определения буферной емкости в отношении щелочных продуктов пробу сыворотки титруют щелочью с индикатором фенолфталеином.

Материал исследования

Сыворотка крови.

Реактивы

1) 0,1М р-р HCl, 2) 0,1М р-р NaOH, 3) 0,5% спиртовый р-р метилоранжа, 4) 0,5% спиртовый р-р фенолфталеина.

Проведение анализа

1. В коническую колбу вносят 1 мл сыворотки крови, 2-3 капли 0,5% спиртового раствора **метилоранжа**. В сыворотке крови (так как рН выше 4,5) метилоранж окрашивается в желтый цвет. Содержимое колбы титруют из бюретки 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% спиртового раствора **фенолфталеина**. В сыворотке крови (при рН ниже 8,2) смесь остается бесцветной. Содержимое колбы титруют из бюретки 0,1М раствором NaOH до слабо-розового окрашивания. Отмечают объем, пошедший на титрование.

Расчет

Рассчитывают отношение количества мл соляной кислоты, идущего на титрование, к количеству мл раствора NaOH.

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 свидетельствует об избытке кислых эквивалентов в крови и состоянии 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, компенсированные и декомпенсированные состояния.

Изменение показателей кислотно-основного состояния при ацидозе и алкалозе отражено в таблице (↑ - увеличение, ↓ - снижение).

Тип нарушения		pH	pCO ₂	Избыток оснований	[НСО ₃ ⁻]
Метаболический	ацидоз	↓	Норма (или ↓)*	↓	↓
	алкалоз	↑	Норма (или ↑)*	↑	↑
Респираторный	ацидоз	↓	↑	Норма (или ↑)**	Норма (или ↑)**
	алкалоз	↑	↓	Норма (или ↓)**	Норма (или ↓)**
<p>Примечание</p> <p>* При метаболических нарушениях изменение pCO₂ является компенсаторным.</p> <p>** При респираторных нарушениях сдвиги избытка оснований и [НСО₃⁻] являются компенсаторными.</p>					

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 т.п.) вследствие следующих причин:

- 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;
- нарушение выведения кислых продуктов – при острой и хронической почечной недостаточности, сопровождающейся задержкой ионов NH₄⁺, SO₄²⁻, HPO₄²⁻;
- потеря бикарбоната при почечной канальцевой недостаточности или диарее;
- избыточное введение кислот с токсичными жидкостями или при отравлении лекарственными препаратами.

Респираторный ацидоз – характеризуется увеличением концентрации углекислоты и повышением парциального давления CO₂ в крови выше 50 мм рт.ст.

- высокая концентрация CO₂ во вдыхаемом воздухе;
- недостаточность легочной вентиляции – угнетение дыхательного центра, стеноз дыхательных путей, отеки гортани

ни, хронический бронхит, уменьшение активной массы легких.

Метаболический алкалоз – состояние дефицита водородных ионов в крови в сочетании с избытком оснований. Часто сопровождается снижением концентрации калия в крови. Причинами являются:

- потеря HCl при рвоте;
- потеря H^+ в почках,
- избыток минералокортикоидов;
- дефицит K^+ ;
- накопление бикарбонатов при передозировке нейтрализующих ацидоз препаратов.

Респираторный алкалоз – характеризуется снижением pCO_2 ниже 36 мм рт.ст. и повышением pH выше 7,50 при неадекватно высокой легочной вентиляции по сравнению с продукцией углекислоты в организме. Причинами являются:

- возбуждение дыхательного центра – опухоль, черепно-мозговая травма, энцефалит;
- гипервентиляция при гипоксии – горная болезнь, пониженное содержание O_2 во вдыхаемом воздухе.

Оформление работы

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

Лабораторная работа 2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ pH МОЧИ

Принцип

Определение проводится с помощью индикаторной бумаги или диагностических полосок, имеющих тест-зону для определения pH. 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 pH 5,0-9,0.

Материал исследования

Моча.

Проведение анализа

Не прикасаясь руками к зоне индикации, из пенала упаковки берут полоску и погружают на 1-2 секунды в исследуемую мочу. Капли мочи удаляют, проведя полоской по краю сосуда. Полоски оставляют в горизонтальном положении. Через 1 минуту по цветной шкале на упаковке определяют величину pH.

Нормальные величины

Моча

5,0-6,5

Влияющие факторы

При преимущественно белковом питании реакция мочи кислая, при растительной диете – щелочная. Кислая реакция мочи обусловлена, прежде всего, ионами H_2PO_4^- и NH_4^+ , а щелочная – ионами HCO_3^- .

Клинико-диагностическое значение

Резко кислая реакция мочи наблюдается при лихорадочных состояниях, сахарном диабете, голодании и т.д. Щелочная реакция мочи отмечается при циститах и пиелитах, сильной рвоте, введении бикарбоната натрия и употреблении щелочных минеральных вод.

Кислотность мочи определяет возможность образования тех или иных типов мочевых камней. Мочекислые камни (уратные) чаще всего образуются при pH ниже 5,5, оксалатные – при pH 5,5-6,0, кальций-фосфатные – при pH 7,0-7,8.

Оформление работы

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

Лабораторная работа 3

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ НЕОРГАНИЧЕСКИХ ФОСФАТОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И МОЧЕ

Принцип

Фосфорная кислота сыворотки крови в кислой среде реагирует с ванадатом и молибдатом аммония с образованием фосфорно-ванадиево-молибденовой кислоты желтого цвета. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации неорганического фосфора в пробе и определяется фотометрически.

Материал исследования

Сыворотка крови. Моча, разведение 1:5.

Реактивы

1) 10% трихлоуксусная кислота, 2) рабочий раствор, содержащий 1 ммоль/л аммония молибдата и 1 ммоль/л аммония ванадата.

Стандартный раствор KH_2PO_4 , 2,5 ммоль/л.

Проведение анализа

	Опыт 1, мл	Опыт 2, мл	Стандарт, мл
Сыворотка	0,2	—	—
Моча, разведение 1:5	—	0,2	—
Стандартный раствор	—	—	0,2

Дист. вода	0,6	0,6	0,6
ТХУ	0,8	0,8	0,8
	Через 5-8 минут пробы фильтруют или центрифугируют 10 минут при 1500 об/мин		
Супернатант	0,8	0,8	0,8
Рабочий раствор	1,0	1,0	1,0
	Перемешивают. Через 20 минут измеряют оптическую плотность опытных проб и стандарта против воды при длине волны 670 нм (красный светофильтр)		

Расчет

$$\text{Концентрация фосфатов сыворотки, ммоль/л} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}}$$

$$\text{Концентрация фосфатов мочи, ммоль/сут} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}} \times 5 \times Д, \text{ где}$$

$E_{\text{оп}}$ — оптическая плотность пробы, $E_{\text{ст}}$ — оптическая плотность стандарта, $C_{\text{ст}}$ — концентрация стандартного раствора, 5 – разведение мочи, Д – величина диуреза (1300-1500 мл/сут).

Нормальные величины

Сыворотка

0,81-1,48 ммоль/л

Моча

25,8-48,4 ммоль/сут

Практическое значение

Концентрация фосфатов в сыворотке крови и моче прежде всего зависит от функции паращитовидных и щитовидных желез, функции почек, регулирующего влияния кальцитриола.

Сыворотка

Гиперфосфатемия наблюдается при почечной недостаточности, гипертиреозе, гипопаратиреозидизме, акромегалии, заживлении костных переломов, метастазах в кости, передозировке витамина D, остром дыхательном ацидозе, может быть при миеломной болезни.

Снижение концентрации фосфатов отмечается при инфузии глюкозы и гиперинсулинизме, так как инсулин способствует транспорту фосфора в клетки; диабетическом кетоацидозе, так как глюкозурия повышает экскрецию фосфатов с мочой; гипокалиемии, гиперпаратиреозе, при рахите и остеомаляции, остром алкоголизме, синдроме мальабсорбции.

Моча

Выделение фосфатов *возрастает* при ускорении катаболических процессов в организме – гипертиреоз, менингит, диабетический кетоацидоз, лейкоз, нарушение функции почек.

Снижение концентрации в моче отмечается при туберкулезе, гипофункции паращитовидных желез.

Оформление работы

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

Лабораторная работа 4

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ КАЛЬЦИЯ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И МОЧЕ

Принцип

В кислой среде ионы кальция взаимодействуют с индикаторным реактивом арсеназо-III с образованием комплекса малинового цвета. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации ионов кальция в пробе и определяется колориметрически.

Материал исследования

Сыворотка крови. Моча.

Реактивы

1) Рабочий реагент, содержащий арсеназо-III в ацетатном буфере.

Стандартный раствор кальция углекислого, 2,5 ммоль/л.

Проведение анализа

	Опыт 1, мл	Опыт 2, мл	Контроль, мл
Сыворотка	0,01		—
Моча	—	0,01	—
Стандартный раствор	—	—	0,01
Рабочий реагент	1,0	1,0	1,0
	Тщательно перемешивают. Измеряют оптическую плотность опытных и стандартной проб против воды при длине волны 650-670 нм (красный светофильтр)		

Расчет

$$\text{Концентрация кальция сыворотки, ммоль/л} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}}$$

$$\text{Концентрация кальция мочи, ммоль/сут} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}} \times D, \text{ где}$$

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

Нормальные величины

Сыворотка	2,0-2,6 ммоль/л
Моча	2,5-7,5 ммоль/сут

Клинико-диагностическое значение

Сыворотка

Увеличение концентрации общего кальция крови наблюдается при идиопатической чувствительности к витамину D, гиперпаратиреозе, злокачественных опухолях с поражением и без поражения костей, тиреотоксикозе, акромегалии, лейкозах, миеломной болезни, ацидозе.

Гипокальциемия выявляется при гипотиреозе, хронической почечной недостаточности, нарушении всасывания, гиповитаминозе D, остром панкреатите, прогрессирующей остеомалации, сепсисе (выход через нарушенную систему микроциркуляции), алкоголизме, циррозе печени, гипоальбуминемии, остром алкалозе (усиление связывания кальция с белками).

Моча:

Содержание кальция *возрастает* при метастазах рака или саркомы в кости и при состояниях организма, сопровождающихся гиперкальциемией.

Снижение отмечается при всех случаях снижения содержания кальция в сыворотке, при нефрозах, остром нефрите, дефиците витамина D.

Оформление работы

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

Лабораторная работа 5

КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ 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 исследования

Сыворотка крови. Моча, разведение 1:2.

Реактивы

1) Рабочий реагент, содержащий 2,0 ммоль/л тиоцианата ртути $Hg(SCN)_2$, 30,0 ммоль/л нитрита железа $Fe(NO_3)_3$, 4,0 ммоль/л азотной кислоты HNO_3 .

Стандартный раствор $NaCl$, 100 ммоль/л.

Проведение анализа

	Опыт 1, мл	Опыт 2, мл	Контроль, мл
Сыворотка	0,01		—
Моча, разведение 1:2	—	0,01	—
Раствор $NaCl$	2,0	—	0,01
Рабочий реагент		2,0	2,0
	Тщательно перемешивают. Через 5 минут измеряют оптическую плотность опытных и стандартной проб против воды при длине волны 490 нм (синий светофильтр)		

Расчет

$$\text{Концентрация хлоридов сыворотки, ммоль/л} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}}$$

$$\text{Концентрация хлоридов мочи, ммоль/сут} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}} \times 2 \times D, \text{ где}$$

$E_{\text{оп}}$ — оптическая плотность пробы, $E_{\text{ст}}$ — оптическая плотность стандарта, $C_{\text{ст}}$ — концентрация стандартного раствора, 2 — разведение мочи, D — величина диуреза (1300-1500 мл/сут).

Нормальные величины

Сыворотка

97-108 ммоль/л

Моча

120-240 ммоль/сут

Клинико-диагностическое значение

Сыворотка

Повышение концентрации ионов хлора наблюдается при обезвоживании, вызванном недостаточным поступлением жидкости, при заболеваниях почек, декомпенсации сердца, гипервентиляции (респираторный алкалоз), гипофункции коры надпочечников.

Снижение выявляется при обезвоживании в результате потерь жидкости (рвота, понос, интенсивное потоотделение), при стенозе привратника, почечном диабете, желудочной гиперсекреции, недостаточности коры надпочечников, увеличении объема внеклеточной жидкости, инфекционных заболеваниях и других патологических состояниях. Любая значительная гипохлоремия может привести к компенсационному повышению фракций остаточного азота из-за стремления организма сохранить постоянство осмотического давления.

Моча

Концентрация ионов хлора *растет* при недостаточности коры надпочечников, нефритах, применении диуретиков.

Уменьшение их концентрации отмечается при большой потере хлора через желудочно-кишечный тракт, голодании, синдроме Иценко-Кушинга, при сильном потоотделении.

Оформление работы

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

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один правильный ответ.

1. ГИПОАЛЬБУМИНЕМИЯ ВОЗНИКАЕТ ВСЛЕДСТВИЕ
 - 1) обезвоживания организма
 - 2) инфекционных заболеваний
 - 3) отравления токсинами
 - 4) нарушения усвоения белка
2. ФУНКЦИЕЙ АЛЬБУМИНОВ ЯВЛЯЕТСЯ
 - 1) транспорт эндогенных метаболитов
 - 2) участие в иммунных реакциях
 - 3) участие в свертывании крови
 - 4) регуляция белкового обмена

3. В НАИБОЛЬШЕМ КОЛИЧЕСТВЕ ЖЕЛЕЗО В ОРГАНИЗМЕ ЧЕЛОВЕКА НАХОДИТСЯ В СОСТАВЕ
 - 1) гемоглобина
 - 2) ферритина
 - 3) гемосидерина
 - 4) трансферрина
4. НАИБОЛЬШАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ ФЕРРИТИНА НАБЛЮДАЕТСЯ В
 - 1) печени
 - 2) эритроцитах
 - 3) желудке
 - 4) почках
5. НАИБОЛЬШИЙ ТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ БИЛИРУБИН ОКАЗЫВАЕТ НА
 - 1) гепатоциты
 - 2) нервные клетки
 - 3) мышечные клетки
 - 4) спленоциты
6. ДЛЯ ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ ЖЕЛТУХИ ХАРАКТЕРНО В КРОВИ
 - 1) повышение концентрации прямого билирубина
 - 2) увеличение количества желчных кислот
 - 3) накопление непрямого билирубина
 - 4) повышение концентрации гемоглобина
7. АРТЕРИАЛЬНАЯ КРОВЬ ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ ИМЕЕТ ВЕЛИЧИНУ PH
 - 1) 6,35-7,45
 - 2) 7,35-7,45
 - 3) 7,00-7,25
 - 4) 6,85-7,15
8. ПРИЧИНОЙ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО АЦИДОЗА ЯВЛЯЕТСЯ
 - 1) повышение вязкости крови
 - 2) снижение концентрации углекислоты
 - 3) усиление аммониегенеза
 - 4) гипервентиляция легких
9. РАЗВИТИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО АЦИДОЗА МОЖЕТ БЫТЬ СВЯЗАНО С
 - 1) сильной рвотой
 - 2) использованием гипокалиемических диуретиков
 - 3) накоплением бикарбонат-ионов
 - 4) интенсивной мышечной работой
10. РАЗВИТИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО АЛКАЛОЗА МОЖЕТ БЫТЬ СВЯЗАНО С
 - 1) гемолитической анемией
 - 2) интенсивной рвотой
 - 3) сахарным диабетом

4) гипервентиляцией легких

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

1. Из биохимической лаборатории принесли два анализа содержания белка в крови: 30 г/л и 100 г/л, которые были сделаны у двух больных – ребенка с обширными ожогами и мужчины с гипоацидным гастритом, панкреатитом (воспалением поджелудочной железы).

Укажите больных, которым принадлежат эти анализы. Обоснуйте вывод.

2. У больного выявлено значительное увеличение остаточного азота крови.

Можно ли на основании этого анализа говорить о заболевании почек?

3. У больного затруднено дыхание, оно становится поверхностным, рН крови 7,31, рСО₂ равен 52 ммоль/л, показатель [НСО₃⁻] равен 37 ммоль/л, щелочной резерв увеличен.

Какой вид нарушения кислотно-основного состояния имеется у больного? Укажите механизмы компенсации.

РАЗДЕЛ 12. БИОХИМИЯ ПОЧЕК И ПЕЧЕНИ

ТЕМА 12.1. 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.

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, не только в стационаре, но и в амбулаторных условиях должно сопровождаться обязательным анализом мочи, так как это исследование может помочь в постановке диагноза, а нередко совершенно изменить первоначальные диагностические предположения, оценить эффективность проводимой терапии.

ЦЕЛЬ

Изучить механизмы образования мочи, общие свойства и химический состав мочи в норме и при патологии, роль почек в поддержании кислотно-основного состояния.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Метаболизм почек. Отличие обмена веществ в корковом и мозговом слоях. В какой части почек происходит аэробное и анаэробное окисление глюкозы, глюконеогенез? Особенности обмена белков и липидов в почках. Роль почек в синтезе биологически активных веществ (креатин, эритропоэтин, 1,25-дигидроксихолкальциферол).
2. Роль ферментов в реализации функции почек – глицинаминдотрансфераза, Na^+ , K^+ -АТФаза, глутаматдегидрогеназа, глутаминдезаминаза, щелочная фосфатаза, изоферменты лактатдегидрогеназы.
3. Схема строения нефрона. Процессы образования мочи: фильтрация, реабсорбция и секреция. Места действия и эффект гормонов, регулирующих минеральный и водно-солевой обмен.
4. Характеристика фильтрации, факторы, влияющие на ее скорость и величину. Оценка скорости фильтрации в клинической практике. Клиренс. Вещества, используемые для определения клиренса.

5. Реабсорбция, биохимические реакции, происходящие в просвете канальца и в клетках проксимального и дистального отделов нефрона. Транспорт максимум для глюкозы. Противоточно-умножительный механизм концентрирования мочи.
6. 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. Потребность в чистой воде детей и взрослых. Особенности водного обмена у детей.
7. Опишите факторы, влияющие на количество воды в организме – осмоляльность крови, объем циркулирующей крови, артериальное давление, концентрация натрия и калия.
8. Регуляция реабсорбция воды. Роль антидиуретического гормона. Факторы, стимулирующие его синтез и выделение. Метаболические последствия гипофункции антидиуретического гормона, клинические проявления.
9. Регуляция реабсорбции натрия. Активация и функционирование ренин-ангиотензин-альдостероновой системы. Схема, отражающая роль ренин-ангиотензиновой системы в реабсорбции натрия. Механизм возникновения гипертензии при нарушении кровообращения в почках, причины таких нарушений.
10. Регуляция реабсорбции кальция. Роль 1,25-дигидрокси-холекаль-циферола, 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, относительная плотность, рН. Как изменяются эти показатели при патологических состояниях?
13. Органические и неорганические компоненты мочи здорового человека.
14. Причины появления патологических компонентов мочи – белок, глюкоза, желчные пигменты, кетоновые тела, кровь, ферменты.
15. Принцип методов определения физико-химических свойств мочи (плотность, величина рН). Клинико-диагностическое значение этих показателей. Нормальные величины.
16. Принцип лабораторного определения компонентов мочи – белок, глюкоза, кетоновые тела, билирубин, уробилиноген, гемоглобин, эритроциты. Клинико-диагностическое значение, нормальные величины.

17. Оценка скорости клубочковой фильтрации в клинико-лабораторной диагностике. В чем состоит определение клиренса по креатинину?

ТЕМЫ ДЛЯ РЕФЕРАТИВНЫХ СООБЩЕНИЙ

1. Физиологическая и патологическая протеинурия и креатинурия.
2. Механизм действия диуретических средств. Использование диуретиков в клинической практике.

Лабораторная работа 1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МОЧИ

Материал исследования

Нормальная моча и образцы мочи N 1, 2, 3.

Определение относительной плотности

Оборудование

Урометр, высокий цилиндр для мочи.

Проведение анализа

При наличии пены на поверхности мочи ее удаляют фильтровальной бумагой.

Если мочи мало, то ее можно перед исследованием 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 нее урометр так, чтобы урометр не касался стенок и дна цилиндра. Производят отсчет 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 1,010-1,025

Клинико-диагностическое значение

Относительная плотность нормальной мочи прямо зависит от концентрации растворимых веществ и находится в обратной связи с количеством выделяемой мочи.

Увеличение относительной плотности мочи отмечается при сахарном диабете (глюкозурия), поражении гломерулярного фильтра (протеинурия).

Снижение плотности связано с полиурией любой этиологии.

Определение рН

Принцип

Основан на изменении цвета индикатора в соответствии с рН раствора.

Проведение анализа

Полоску индикаторной бумаги опускают в пробирку с мочой и по изменению цвета, сравнивая с эталонной шкалой на упаковке, устанавливают рН исследуемой мочи.

Нормальные величины

Моча 5,0-6,5

Клинико-диагностическое значение

Преобладание в пище животных белков определяет сдвиг рН мочи в кислую сторону, преобладание растительной пищи – в щелочную.

Кислая реакция мочи отмечается при лихорадочных состояниях, декомпенсированном сахарном диабете, туберкулезе почек, голодании, недостаточности почек.

Щелочная реакция мочи наблюдается при цистите, пиелитах, гематурии, после рвоты, диареи (поноса), при рассасывании экссудатов, хронической инфекции мочевыводящих путей, после приема соды и щелочных минеральных вод.

Оформление работы

Записывают принцип методов и результаты исследования. Результаты данной работы используют для выводов в лабораторной работе 2.

	Выявляемый показатель			
	Плотность	Цвет	Прозрачность	рН
Норма				
Образец N 1				
Образец N 2				
Образец N 3				

Лабораторная работа 2

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОСТАВА МОЧИ

Материал исследования

Нормальная моча и образцы мочи N 1, 2, 3.

Оборудование

Тест-полоски "Глюкофан", "Кетофан", "Диафан", "Альбуфан", "Пентафан", "Билифан", "Иктофан".

Проведение анализа

Не прикасаясь руками к зоне индикации, из пенала упаковки берут полоску и погружают на 1-2 секунды в исследуемую жид-

кость. Капли мочи удаляют, проведя полоской по краю сосуда. Полоски оставляют в горизонтальном положении. Через 1 минуту по цветной шкале на упаковке определяют концентрацию искомого вещества.

Определение глюкозы тест-полосками "Глюкофан"

Принцип

Принцип определения глюкозы основан на ферментной 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, и происходит переход желтой окраски в зеленую.

Нормальные величины

Моча

Глюкоза	тест-полоски "Глюкофан"	проба отрицательна
	другие методы	0,1-0,8 ммоль/л или 1-15 мг/100 мл (мг%)

Клинико-диагностическое значение

Уровень 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 – пиело- и гломерулонефриты, токсические поражения почек, почечный диабет (семейная почечная глюкозурия), нефропатии.

Определение кетоновых тел тест-полосками "Кетофан"

Принцип

Тест основан на реакции Легаля (см. Тема 9.2. "Обнаружение кетоновых тел в моче"). Желтая 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. Таким образом, интенсивность

окраски отражает только концентрацию ацетоуксусной кислоты в моче.

Нормальные величины

Моча

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, при повышении концентрации жиромобилизующих гормонов в крови, при ацетонемических состояниях у детей.

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 pH мочи проба может давать ложноположительные результаты.

Нормальные величины

Моча

Белок	Тест-полоски "Альбуфан"	проба отрицательна
	Другие методы	10-140 мг/л

Клинико-диагностическое значение

Небольшое количество белка в суточной моче обнаруживается и у практически здоровых лиц, однако в разовой порции мочи такие концентрации обычными методами не выявляются. Часть этих белков сывороточного происхождения, другая часть является продуктом клеток мочевыводящих путей.

Принято подразделять протеинурию в зависимости от места возникновения:

- преренальную, связанную с усиленным распадом белка тканей или выраженным гемолизом;
- ренальную, обусловленную патологией клубочков или канальцев почек;
- постренальную, связанную с воспалением мочевыводящих путей.

Определение билирубина и уробилиногена тест-полосками "Иктофан"

Принцип

Полоски содержат две зоны индикации – для билирубина и для уробилиногена.

пятнышками на неокрашенной реагентной зоне или равномерной сине-зеленой окраской всей зоны (макрогематурия).

При отрицательной реакции зона индикации остается желтоватой (без зеленого оттенка).

Нормальные величины

Моча

Эритроциты и гемоглобин	дети	проба отрицательна или слабо положительна
	взрослые	проба отрицательна

Клинико-диагностическое значение

Единичные эритроциты обнаруживаются в моче даже абсолютно здоровых людей. У практически здоровых людей в сутки выделяется до 1 миллиона эритроцитов, что соответствует содержанию в 1 мкл мочи 1 эритроцита.

Гематурия обнаруживается при поражении паренхимы почки (гломерулонефрит, пиелонефрит, опухоли), при тяжелой физической нагрузке, при поражении мочевыводящих путей.

Определение кетоновых тел и глюкозы тест-полосками "Диафан"

Принцип

Полоски содержат две зоны индикации – для кетоновых тел и для глюкозы.

Принцип определения кетоновых тел такой же, как в случае полосок "Кетофан".

Принцип определения глюкозы такой же, как в случае полосок "Глюкофан".

Нормальные величины

Моча

Глюкоза	тест-полоски "Глюкофан"	проба отрицательна
	другие методы	0,1-0,8 ммоль/л или 1-15 мг/100 мл (мг%)
Кетоновые тела	тест-полоски "Кетофан"	проба отрицательна
	другие методы	20-30 мг/сут

Клинико-диагностическое значение

См. для "Глюкофан" и "Кетофан".

Определение pH, 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 pH.

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 в случае полосок "Гемофан".

Принцип определения белка такой же, как в случае полосок "Альбуфан".

Принцип определения кетоновых тел такой же, как в случае полосок "Кетофан".

Принцип определения глюкозы такой же, как в случае полосок "Глюкофан".

Нормальные величины

Моча

Белок	Тест-полоски "Альбуфан"	проба отрицательна
	Другие методы	10-140 мг/л
Кетоновые тела	тест-полоски "Кетофан"	проба отрицательна
	другие методы	20-30 мг/сут
Глюкоза	тест-полоски "Глюкофан"	проба отрицательна
	другие методы	0,1-0,8 ммоль/л или 1-15 мг/100 мл (мг%)
Эритроциты и гемоглобин	дети	проба отрицательна или слабо положительна
	взрослые	проба отрицательна
рН		5,0-6,5

Оформление работы

Записывают принцип методов, результаты исследования образцов мочи и с учетом результатов "Лабораторной работы 1" делают выводы о возможной патологии организма.

Выявляе- мый пока- затель	Вид теста	Образцы мочи			
		Норма	№ 1	№ 2	№ 3
pH	Пентафан				
Глюкоза	Глюкофан Пентафан				
Белок	Альбуфан Пентафан				
Кетоновые тела	Кетофан Диафан Пентафан				
Билирубин	Билифан Иктофан				
Уробилино- ген	Иктофан				
Гемоглобин	Гемофан				
Эритроциты	Гемофан				

Лабораторная работа 3 (теоретически)

ПРОБА РЕБЕРГА – ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЛИРЕНСА КРЕАТИНИНА

Материал исследования

Сыворотка крови. Моча.

Принцип

Если какое-то вещество в стабильной концентрации присутствует в плазме, физиологически инертно, свободно фильтруется в клубочках и не секретировается, не реабсорбируется, не синтезируется и не превращается в почках, то количество этого вещества, профильтрованного в клубочках, равно количеству, выведенному с мочой.

Образовавшийся в организме креатинин практически полностью фильтруется в почечных клубочках и не подвергается реабсорбции в почечных канальцах. Соотношение концентраций креатинина в моче и плазме крови за определенный промежуток времени позволяет судить о фильтрующей способности почек.

Проведение анализа

Обследуемый выпивает натощак 400-500 мл воды или слабого чая. Немедленно идет в туалет. После мочеиспускания отмечают точное время. Через 30 минут берут кровь из вены и определяют концентрацию креатинина в крови. Через час собирают мочу полностью и определяют ее общий объем, вычисляют минутный диурез и определяют концентрацию креатинина в моче

(см Тема 5.3. "Определение содержания креатинина в сыворотке крови и моче").

Расчет

$$C = \frac{U}{P} \times D, \text{ где}$$

C – показатель клиренса, D – минутный диурез,
U и P – концентрация креатинина в моче и плазме соответственно.

Нормальные величины

Скорость клубочковой фильтрации по креатинину 80-120 мл/мин

Клинико-диагностическое значение

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, клинико-диагностическое значение и методику проведения анализа.

ТЕМА 12.2. УЧАСТИЕ ПЕЧЕНИ В МЕТАБОЛИЗМЕ ВЕЩЕСТВ. БИОТРАНСФОРМАЦИЯ КСЕНОБИОТИКОВ

АКТУАЛЬНОСТЬ

Печень является центральным органом метаболизма и отвечает за поддержание на постоянном уровне многих параметров крови. Нарушения функций печени или ферментного состава гепатоцитов приводят к метаболическим сдвигам как в самой печени, так и в других органах.

ЦЕЛЬ

Изучение функции печени, ее роли в биотрансформации веществ.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Анатомическое и гистологическое строение печени. Функции печени.
2. Участие печени в углеводном обмене. Процессы поддержания гомеостаза глюкозы крови. Гормоны, влияющие на печень.
3. Участие печени в липидном обмене. Роль печени в синтезе и транспорте эндогенных триацилглицеролов и холестерина. Какие липопротеины образуются в печени? Нарушение выведения ТАГ из печени, причины и последствия.

4. Роль печени в синтезе альбуминов и глобулинов крови, белков свертывающей системы, плазмоспецифичных ферментов.
5. Роль печени в синтезе биологически активных веществ на экспорт (креатин, 25-оксихолекальциферол, соматомедины), в образовании желчных кислот и желчных пигментов. Состав желчи и ее роль в пищеварении. Биохимические причины нарушения синтеза и секреции желчи.
6. Процесс биотрансформации ксенобиотиков. Роль печени в общей схеме превращения чужеродных соединений. Печеночные системы биотрансформации веществ.
7. Процесс микросомального окисления. Реакции микросомального окисления, отметьте роль НАДФН, цитохрома P₄₅₀, цитохрома b₅.
8. Процесс конъюгации. Строение УДФ-глюкуроновой кислоты (УДФГК) и фосфоаденозинфосфосерной кислоты (ФАФС). Реакции образования прямого билирубина, животного индикана.
9. Причина усиления токсичных свойств соединений в результате биотрансформации. Что такое химический канцерогенез? Примеры.
10. Исследование биотрансформации веществ с помощью амидопириновой пробы.

ТЕМЫ ДЛЯ РЕФЕРАТИВНЫХ СООБЩЕНИЙ

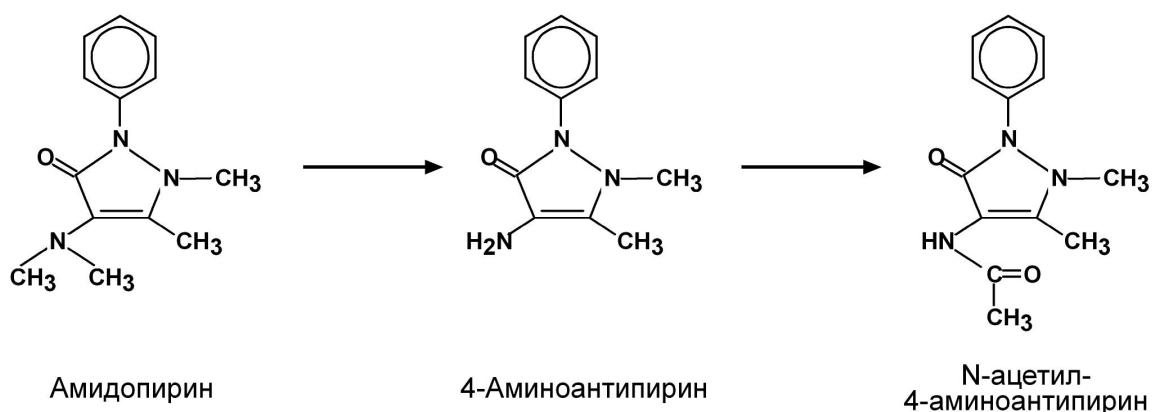
1. Усиление токсичных свойств соединений в результате биотрансформации. Химический канцерогенез.
2. Афлатоксины. Нитраты, нитриты и нитрозамины. Анилиновые красители. Их характеристика, токсичность и возможность обезвреживания в организме.
3. Метаболизм этанола. Механизмы токсического действия этанола. Современные представления о ферментативных путях метаболизма этанола: алкогольоксилирующие ферментные системы.

Лабораторная работа 1

ИССЛЕДОВАНИЕ ОБЕЗВРЕЖИВАЮЩЕЙ СИСТЕМЫ ПЕЧЕНИ

Исследование биотрансформации веществ с помощью амидопириновой пробы

Биотрансформация амидопирина (2,3-диметил-1-фенил-4-диметиламинопиразолон-5, пирамидон) осуществляется микросомальной и конъюгационной системами печени. Первый этап процесса, N-деметилирование, осуществляется ферментами печени с образованием 4-аминоантипирина. На втором этапе 4-аминоантипирин подвергается ацетилированию с участием ацетил-SКоА с образованием N-ацетил-4-аминоантипирина.



Принцип

Исследование связано с определением концентрации 4-аминоантипирина в моче. При взаимодействии с фенолом в щелочной среде и присутствии гексацианоферрата калия (III) ($K_3[Fe(CN)_6]$, красная кровяная соль) 4-аминоантипирин образует соединение типа индофенола, имеющего розовую окраску.

Материал исследования

Моча.

Реактивы

1) Аммиачный буфер, pH 10,5-10,6 (20 г хлорида аммония растворяют в 100 мл 25% раствора аммиака); 2) 0,02% раствор фенола перекристаллизованного; 3) 12,5% раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ); 4) 36% раствор соляной кислоты; 5) 1% раствор гексацианоферрата (III) калия $K_3[Fe(CN)_6]$.

Стандартный раствор 4-аминоантипирина 1 г/л для построения калибровочного графика.

Проведение анализа

Обследуемый принимает утром натощак амидопирин из расчета 6 мг/кг веса ($A_{общ}$). Собирается 4 порции мочи в интервале соответственно от 1 до 6 часов, 6-12, 12-24 и 45-48 часов. Объем мочи измеряется. Не позже чем через 24 часа, моча центрифугируется или фильтруется.

Далее исследуется концентрация 4-аминоантипирина (опыт 1) и N-ацетил-4-аминоантипирина (опыт 2):

	Опыт 1,мл	Опыт 2,мл
Моча	1,5	1,5
Аммиачный буфер	0,3	—
Соляная кислота	0,3	0,3
	Выдержать 15 минут при комнатной температуре	Закрыть пробкой. Выдержать 15 минут при 100°C
	Пробирки охлаждают и центрифугируют при 1500 об/мин	

Аммиачный бу- фер	—	0,6
		Вновь центрифугируют при 1500 об/мин
Надосадок	0,6	0,8
Дистилл. вода	—	0,2
ТХУ	0,5	—
Раствор фенола	2,0	2,0
Р-р $K_3[Fe(CN)_6]$	0,1	0,1
	Инкубируют 10 минут при 20-25°C. Не позднее чем через 60 минут измеряют оптическую плотность проб против воды при 510 нм (зеленый свето- фильтр)	

Расчет

Концентрацию продуктов биотрансформации амидопирина в моче (мг/л) определяют по калибровочному графику, построенному с использованием калибровочных растворов антипирина в диапазоне от 3 до 20 мг/л.

Количество 4-аминоантипирина (A_1 , мг в порции мочи) находят, умножая его концентрацию (опыт 1) на соответствующий объем мочи (л).

Общее количество 4-аминоантипирина и N-ацетил-4-аминоантипирина (A_{1+2} , мг в порции мочи) находят, умножая их концентрацию (опыт 2) на соответствующий объем мочи (л).

Количество N-ацетил-4-аминоантипирина (A_2), выделенного с мочой за сутки, находят по разности содержания в опыте 1 и опыте 2.

Монооксигеназную активность печени оценивают по формуле:

$$\text{Активность монооксигеназ (\%)} = \frac{A_1}{A_{\text{общ}}} \times 100, \text{ где}$$

A_1 – количество 4-аминоантипирина в порции мочи,
 $A_{\text{общ}}$ – количество введенного амидопирина.

Ацетилирующую активность ферментных систем печени находят по формуле:

$$\text{Активность трансфераз (\%)} = \frac{A_2 - A_1}{A_1} \times 100, \text{ где}$$

A_2 – количество N-ацетил-4-аминоантипирина в порции мочи, A_1 – количество 4-аминоантипирина в порции мочи.

Общую обезвреживающую способность ферментных систем печени оценивают по формуле:

$$\text{Общая активность (\%)} = \frac{A_{1+2}}{A_{\text{общ}}} \times 100$$

Клинико-диагностическое значение

Изучение скорости метаболизма лекарственных веществ, поступающих в организм, позволяет оценивать активность ферментных систем печени, участвующих в биотрансформации ксенобиотиков.

Снижение скорости наблюдается при заболеваниях печени (цирроз, гепатит), с увеличением возраста.

Увеличение скорости наблюдается при регулярном приеме некоторых веществ – барбитураты, этанол.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один правильный ответ.

1. НЕОБХОДИМОЕ КОЛИЧЕСТВО ЧИСТОЙ ВОДЫ В СУТОЧНОМ РАЦИОНЕ РЕБЕНКА ПЕРВОГО ГОДА ЖИЗНИ СОСТАВЛЯЕТ
 - 1) 15 мл на кг веса
 - 2) 30 мл на кг веса
 - 3) 100 мл на кг веса
 - 4) 500 мл на кг веса
2. МИНИМАЛЬНОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ ВОДЫ У ВЗРОСЛОГО В СУТКИ СОСТАВЛЯЕТ
 - 1) 100 мл
 - 2) 200 мл
 - 3) 700 мл
 - 4) 1400 мл
3. ВОДНО-СОЛЕВОЙ БАЛАНС НЕ РЕГУЛИРУЕТ
 - 1) антидиуретический гормон
 - 2) ренин-альдостероновая система
 - 3) атриопептиновая система
 - 4) гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система
4. В ПОЧКАХ СИНТЕЗИРУЕТСЯ РЕГУЛЯТОР ТОНУСА ГЛАДКИХ МЫШЦ СОСУДОВ
 - 1) брадикинин
 - 2) норадреналин
 - 3) окситоцин
 - 4) вазопрессин
5. РЕГУЛИРУЕМАЯ РЕАБСОРБЦИЯ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ ПРОИСХОДИТ В
 - 1) проксимальных канальцах
 - 2) дистальных канальцах
 - 3) восходящей части петли Генле
 - 4) собирательных трубочках
6. РЕГУЛИРУЕМАЯ РЕАБСОРБЦИЯ ВОДЫ ПРОИСХОДИТ В
 - 1) проксимальных канальцах

- 2) на всем протяжении нефрона
 - 3) восходящей части петли Генле
 - 4) дистальных канальцах и собирательных трубочках
7. ПОВЫШЕНИЕ УРОВНЯ PH КРОВИ ПОЧКАМИ ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ БЛАГОДАРЯ АКТИВАЦИИ
- 1) аммониегенеза
 - 2) реабсорбции натрия
 - 3) реабсорбции воды
 - 4) секреции мочевой кислоты
8. НАСЫЩЕННО-ЖЕЛТЫЙ ЦВЕТ МОЧИ СИГНАЛИЗИРУЕТ О
- 1) беременности
 - 2) оротатацидурии
 - 3) обезвоживании
 - 4) интоксикации
9. ВМЕСТЕ С ЖЕЛЧЬЮ ПЕЧЕНЬ ВЫВОДИТ ИЗ ОРГАНИЗМА
- 1) гемоглобин
 - 2) оксикальциферол
 - 3) триацилглицеролы
 - 4) холестерол
10. РЕАКЦИИ МИКРОСОМАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ КАТАЛИЗИРУЕТ
- 1) цитохромоксидаза
 - 2) цитохром P₄₅₀
 - 3) УДФ-глюкуронил-трансфераза
 - 4) глутатионпероксидаза.

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

1. Больной длительное время находился в постели в неподвижном состоянии по поводу болезни сердца. Проведенный анализ мочи показал нарастание содержания солей Ca²⁺.

Связано ли это с основной болезнью или с какой-либо другой причиной?

2. Несколько лыжников совершили большой переход в условиях холодной погоды. У некоторых лыжников при исследовании в моче обнаружен белок.

Почему появился белок у здоровых спортсменов?

3. У женщины внезапно появились боли в области печени, быстро развилось желтушное окрашивание склер, кожи, кал приобрел светлую окраску, моча приобрела цвет темного пива.

Какие нарушения пигментного обмена могут быть обнаружены, какой тип желтухи?

4. У больного в крови и моче повышено содержание индола, количество индикана уменьшено.

О нарушении какой функции печени свидетельствуют данные анализа?

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ К ИТОГОВОМУ ЗАНЯТИЮ

1. Иерархия регуляторных систем. Место гормонов в регуляции метаболизма и функции органов.
2. Отличие мембранного и цитозольного механизмов передачи гормонального сигнала в клетку.
3. Мембранные механизмы передачи гормонального сигнала в клетку. Три вида рецепторов: с ферментативной активностью, с ионопроводящей активностью и связанные с G-белками.
4. Охарактеризуйте рецепторы, связанные с G-белками:
 - системы вторичных посредников и их взаимодействие,
 - аденилатциклазный механизм действия гормонов,
 - кальций-фосфолипидный механизм действия гормонов,
5. Общая характеристика гуанилатциклазного механизма действия гормонов.
6. Цитозольный механизм действия гормонов.
7. Классификация гормонов по химическому строению, биологическим функциям и принадлежности к эндокринным железам. Роль либеринов, статинов, тропных гормонов. В чем заключается обратная отрицательная связь в регуляции синтеза и действия гормонов?
8. Характеристика соматотропного гормона: химическая природа, место синтеза, органы-мишени, локализация рецепторов и механизм действия, влияние на обмен веществ и воды. Как регулируются синтез и секреция гормона? Состояния, связанные с нарушением действия гормона.
9. Характеристика антидиуретического гормона (вазопрессин): химическая природа, место синтеза, органы-мишени, локализация рецепторов и механизм действия, влияние на обмен веществ и воды. Регуляция синтеза и секреции гормона. Состояния, обусловленные нарушением действия гормона.
10. Характеристика окситоцина: химическая природа, место синтеза, органы-мишени, локализация рецепторов и механизм действия, эффекты. Как регулируются синтез и секреция гормона?
11. Характеристика паратгормона и кальцитонина: химическая природа, место синтеза, органы-мишени, локализация рецепторов и механизм действия, влияние на обмен кальция и фосфатов. Регуляция синтеза и секреции гормона. Какова их роль в обмене кальция и фосфатов витамина D₃?
12. Гормоны поджелудочной железы глюкагон и инсулин: их химическая природа, место синтеза, органы-мишени, локализация рецепторов и механизм действия, влияние на обмен углеводов, белков, липидов (ферменты, регулируемые гормоном).

- Регуляция синтеза и секреции гормона. Состояния, обусловленные отсутствием или избытком действия гормона.
13. Современные представления о механизмах развития инсулинзависимого сахарного диабета. Важнейшие изменения гормонального статуса и обмена веществ при сахарном диабете, биохимические механизмы развития осложнений сахарного диабета и диабетической комы.
 14. Характеристика тиреотропного гормона: химическая природа, место синтеза, органы-мишени, локализация рецепторов и механизм действия, эффекты. Как регулируются синтез и секреция гормона?
 15. Гормоны щитовидной железы тироксин и трийодтиронин: химическая природа, место синтеза, органы-мишени, локализация рецепторов и механизм действия, влияние на обмен углеводов, белков, липидов. Как регулируется синтез и секреция гормона? Состояния, обусловленные отсутствием или избытком действия гормона.
 16. Адреналин: химическая природа, место 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. В чем заключается участие адреналина в адаптивных реакциях организма при стрессе?
 17. Характеристика адренокортикотропного гормона: химическая природа, место синтеза, органы-мишени, локализация рецепторов и механизм действия, влияние на обмен веществ. Как регулируются синтез и секреция гормона? Состояния, обусловленные отсутствием или избытком действия гормона.
 18. Глюкокортикоиды: химическая природа, место и этапы синтеза, органы-мишени, локализация рецепторов и механизм действия, влияние на обмен углеводов, белков, липидов (ферменты, регулируемые гормоном). Регуляция синтеза и секреции гормона. Состояния, обусловленные отсутствием или избытком действия гормона. Причины использования глюкокортикоидов в качестве противовоспалительных и противоаллергических лекарственных средств. Участие глюкокортикоидов в адаптивных реакциях организма при стрессе.
 19. Минералокортикоиды: их химическая природа, место и этапы синтеза, органы-мишени, локализация рецепторов и механизм действия, влияние на обмен электролитов и воды. Каким образом регулируются синтез и секреция гормонов? Роль ренин-ангиотензиновой системы. Состояния, обусловленные отсутствием или избытком действия гормона. Биохимические механизмы развития почечной гипертензии.

20. Лактотропный гормон: химическая природа, место и этапы синтеза, органы-мишени, локализация рецепторов и механизм действия, влияние на обмен веществ. Как регулируются синтез и секреция гормона?
21. 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.
22. Андрогены и эстрогены: химическая природа, место и этапы синтеза, органы-мишени, локализация рецепторов и механизм действия, влияние на обмен углеводов, белков, липидов. Как регулируются синтез и секреция гормонов. Использование аналогов андрогенов и эстрогенов в качестве лекарственных средств.
23. Принцип обнаружения и реакции определения адреналина, инсулина и тироксина.
24. Понятие общего белка крови, компоненты, входящие в его состав. Физиологические функции белков крови, нормальные показатели их концентрации. Причины изменения концентрации общего белка в крови.
25. Белковые фракции сыворотки крови. Характеристика альбуминов, причины гипо-, гипер- и анальбуминемий. Глобулины и их основные фракции. Основные представители глобулиновых фракций (см. Приложение 2). Биологическая роль альбуминов и глобулинов. Нормальные показатели белковых фракций. Диспротеинемии и парапротеинемии. Причины изменения концентрации белковых фракций в крови. Изменение соотношения белковых фракций при заболеваниях печени, почек, остром и хроническом воспалении, опухолях (протеинограммы).
26. Небелковые азотсодержащие компоненты крови – фракции остаточного азота, их характеристика. Роль и метаболизм мочевины, креатинина, мочевой кислоты. Клинико-диагностическое значение определения этих веществ в крови, их нормальные показатели. Причины и последствия гипераммониемий и азотемий.
27. Характеристика ферментов крови – плазмоспецифичные, индикаторные, экскреторные ферменты. Примеры. Использование ферментов крови для диагностики заболеваний.
28. Принцип методов и ход определения компонентов крови:
- общего белка сыворотки крови с помощью биуретовой реакции и рефрактометра;
 - разделение белков сыворотки крови методом электрофореза;

- колориметрический метод определения остаточного азота сыворотки крови (метод Асселя);
29. Особенности метаболизма эритроцита. Роль гликолиза и пентозофосфатного пути.
 30. Метаболизм железа. Пищевые источники, нормы потребления, транспорт, депонирование и мобилизация, роль трансферрина и ферритина. Каковы клинические и лабораторные признаки недостаточности железа?
 31. Строение молекулы гемоглобина. Строение гема. Нормальные и патологические формы гемоглобина. Механизм регуляции сродства гемоглобина к кислороду – кооперативный эффект, эффект Бора, роль 2,3-дифосфоглицериновой кислоты.
 32. Реакции синтеза гема и гемоглобина. Регуляция процессов синтеза. Характеристика нарушений обмена гемоглобина – порфирии, талассемии, гемоглобинозы.
 33. Реакции распада гема, образования билирубина и билирубинглюкуронида, их локализация. Основные этапы превращения желчных пигментов в организме. Пути выведения билирубина и других желчных пигментов.
 34. Нарушения обмена желчных пигментов. Лабораторные критерии различных видов желтух (надпеченочные, печеночные, подпеченочные).
 35. Нарушения пигментного обмена у детей: 1) гемолитические желтухи; 2) физиологические желтухи новорожденных и доношенных; 3) наследственные нарушения обмена билирубина – синдромы Жильбера-Мейленграхта, Дубина-Джонсона, Криглера-Найара.
 36. Принцип и ход реакций обнаружения желчных пигментов и билирубина в моче.
 37. Методы количественного определения гемоглобина и общего билирубина и его фракций в сыворотке крови.
 38. Дыхательная функция крови. Механизмы транспорта кислорода и углекислого газа.
 39. Характеристика показателей кислотно-основного состояния (см. Приложение 3). Химические и физиологические механизмы регуляции кислотно-основного состояния. Взаимосвязь транспорта кислорода и углекислого газа с механизмами поддержания кислотно-основного состояния.
 40. Роль почек в регуляции кислотно-основного состояния: реабсорбция бикарбонатов, ацидогенез, аммионогенез.
 41. Нарушения кислотно-основного состояния, его причины, изменение показателей кислотно-основного состояния. Способы компенсации при различных нарушениях КОС.

42. Методы количественного определения буферной емкости крови.
43. Принцип количественного определения содержания ионов фосфора, кальция и хлора в сыворотке крови и моче. Клинико-диагностическое значение, нормальные показатели.
44. Характеристика биохимических процессов в нефроне. Протиточно-умножительный механизм образования мочи. Особенности реабсорбции электролитов и воды в различных отделах нефрона. Роль гормонов в процессах реабсорбции.
45. Состав и физико-химические свойства мочи. Нормальные и патологические компоненты мочи, их клинико-диагностическое значение, нормальные показатели.
46. Принцип методов и ход определения физико-химических свойств мочи:
- определение относительной плотности мочи;
 - определение рН мочи с помощью индикаторной бумаги.
47. Принцип методов и ход определения патологических компонентов мочи:
- определение концентрации белка, глюкозы, кетоновых тел, желчных пигментов, гемоглобина при помощи тест-полосок "Альбуфан", "Глюкофан", "Кетофан", "Диафан", "Билифан", "Иктофан", "Гемофан", "Пентафан";
 - качественная реакция на белок с сульфосалициловой кислотой (см. Тема 7.2. "Определение содержания белка в моче");
 - полуколичественное определение белка методом Роберта-Стольникова (см. Тема 7.2. "Определение содержания белка в моче");
 - определение глюкозы в моче по Альтгаузену (см. Тема 8.2. "Полуколичественное определение концентрации глюкозы в моче по Альтгаузену");
 - качественные реакции Троммера и Феллинга на глюкозу (см. Тема 8.1. "Обнаружение глюкозы в моче");
 - качественные реакции Легалля и Либена на кетоновые тела (см. Тема 9.2. "Обнаружение кетоновых тел в моче");
 - качественные реакции Розина, Гмелина и Розенбаха, проба с молибдатом аммония на желчные пигменты в моче (см. Тема 11.2. "Обнаружение билирубина в моче").

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

КЛАССИФИКАЦИЯ И НОМЕНКЛАТУРА ФЕРМЕНТОВ

В 1961 г. в Москве Комиссия по ферментам Международного биохимического союза (IUBMB) приняла современную систематическую классификацию ферментов.

В соответствии с систематической классификацией учитывается реакционная и субстратная специфичность ферментов. Ферменты делятся:

- на **классы** – по типу катализируемой реакции,
- каждый класс подразделяется на **подклассы** – по природе атакуемой химической группы,
- подклассы делятся на **подподклассы** – по характеру атакуемой связи или по природе акцептора или кофермента.

Выделяют 6 классов ферментов:

I. Оксидоредуктазы

II. Трансферазы

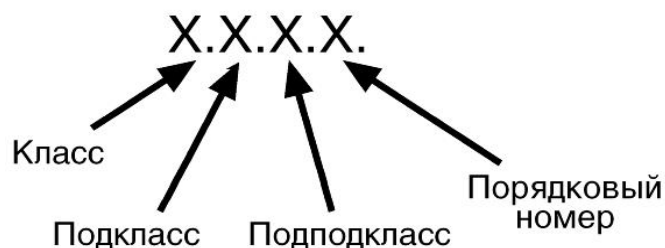
III. Гидролазы

IV. Лиазы

V. Изомеразы

VI. Лигазы

Каждому ферменту присваивается четырехзначный классификационный номер.



Например, *алкогольдегидрогеназа* имеет номер КФ 1.1.1.1. – это оксидоредуктаза, действует на ОН-группу донора с НАД⁺ в качестве акцептора с первым порядковым номером в своем подподклассе; *лактатдегидрогеназа* – КФ 1.1.1.27.

Ферменты могут иметь тривиальное или систематическое название:

1. Систематическое название – согласно современной классификации (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>). Зачастую такое название сложно для использования, тогда оно упрощается и вводится рабочее название фермента.

2. Тривиальное название – название, сложившееся исторически, которое более употребимо, например, **пепсин**, **трипсин**. Иногда к названию субстрата добавляется окончание "-аза" – **уреаза**, **амилаза**, **липаза**. Тем не менее, у всех таких ферментов есть и систематическое название.

I КЛАСС. ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ

Ферменты катализируют окислительно-восстановительные реакции, лежащие в основе биологического окисления. Класс на-

считывает 22 подкласса. Коферментами этого класса являются НАД⁺, НАДФ⁺, ФАД, ФМН, убихинон, глутатион, липоевая кислота.

В **подклассы** выделяются группы ферментов, действующие на:

- 1.1. СН-ОН группу доноров;
- 1.2. альдегидную или кетонную группу доноров;
- 1.3. СН-СН группу доноров;
- 1.4. СН-NH₂ группу доноров;
- 1.5. СН-NH группу доноров;
- 1.6. НАДН или НАДФН в качестве доноров;
- 1.8. содержащие серу группы доноров;
- 1.9. гем-содержащие доноры;
- 1.10. дифенолы в качестве доноров;
- 1.11. пероксид водорода в качестве акцептора;
- 1.11. водород в качестве донора;
- 1.13. один донор с включением молекулярного кислорода;
- 1.14. два донора с включением молекулярного кислорода;
- 1.15. супероксидные радикалы в качестве акцептора;
- 1.17. СН₂ группу доноров;
- 1.18. ферредоксин в качестве донора.

На **подподклассы** деление производится в зависимости от акцептора – НАД⁺ или 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 следующие:

1. **Дегидрогеназы** – оксидоредуктазы, катализирующие дегидрирование субстрата с использованием в качестве акцептора водорода любых молекул, кроме кислорода.

2. Если перенос водорода от молекулы донора трудно доказать, то такие оксидоредуктазы называют **редуктазами**.

3. **Оксидазы** – оксидоредуктазы, катализирующие окисление субстратов с молекулярным кислородом в качестве акцептора электронов без включения кислорода в молекулу субстрата.

4. **Моноксигеназы** – оксидоредуктазы, катализирующие внедрение одного атома кислорода в молекулу субстрата с молекулярным кислородом в качестве донора кислорода.

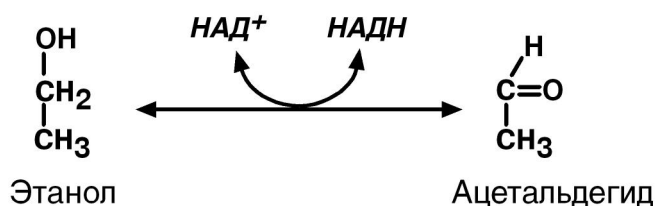
5. **Диоксигеназы** – оксидоредуктазы, катализирующие внедрение двух атомов кислорода в молекулу субстрата с молекулярным кислородом в качестве донора кислорода.

6. **Пероксидазы** – оксидоредуктазы, катализирующие реакции с пероксидом водорода в качестве акцептора электронов.

Систематическое название оксидоредуктаз образуется следующим образом:

Донор электронов : акцептор электронов – оксидоредуктаза

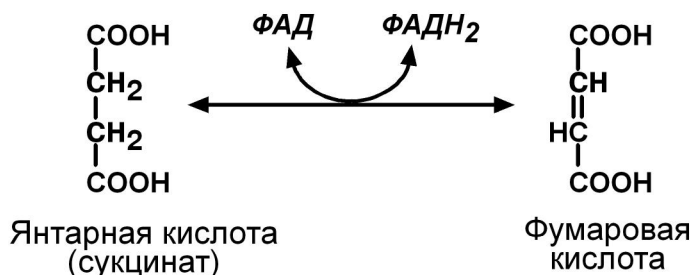
Пример 1



Характеристика фермента

Систематическое название	Алкоголь:НАД-оксидоредуктаза
Рабочее название	Алкогольдегидрогеназа
Класс	1. Оксидоредуктазы
Подкласс	1.1. Действующие на СН-ОН-группу доноров
Подподкласс	1.1.1. с НАД ⁺ или НАДФ ⁺ в качестве акцептора
Классификационный номер	КФ 1.1.1.1.
Кофакторы	Никотинамидадениндинуклеотид. Железо или цинк.

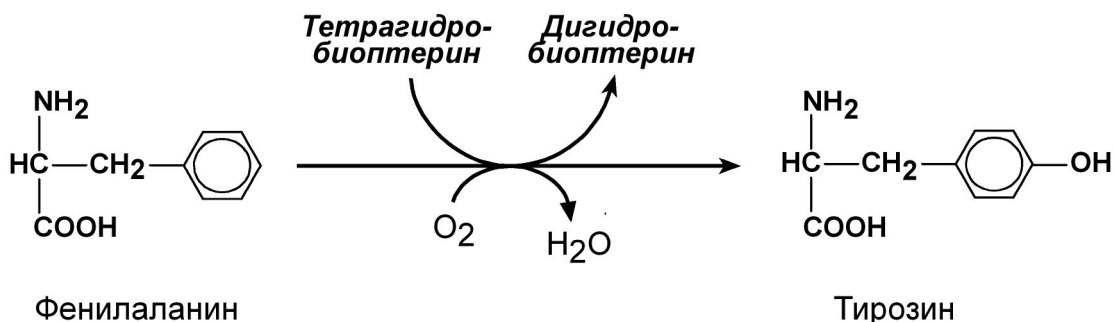
Пример 2



Характеристика фермента

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



Характеристика фермента

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 одного 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. Коферментами являются пиридоксальфосфат, коэнзим А, ТГФК, метилкобаламин. Класс подразделяется на 9 подклассов в зависимости от строения переносимых ими групп.

В подклассы выделяются группы ферментов 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;
- 2.5. переносящие неметильные алкильные и арильные группы;
- 2.6. переносящие азотсодержащие группы;
- 2.7. переносящие фосфорсодержащие группы.
- 2.8. переносящие сульфосодержащие группы.
- 2.9. переносящие селенсодержащие группы.

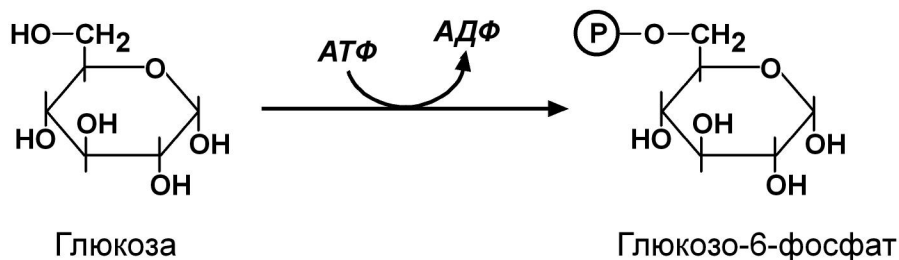
На подподклассы деление производится в зависимости от природы переносимой группы, например: подподкласс 2.1.1. –

метил, подподкласс 2.1.2. –карбоксиметил или формил, подподкласс 2.6.1. – амино-, амидино-, оксиаминогруппы.

Систематическое название трансфераз образуется следующим образом:

Донор группы : акцептор группы – переносимая группа трансфераза

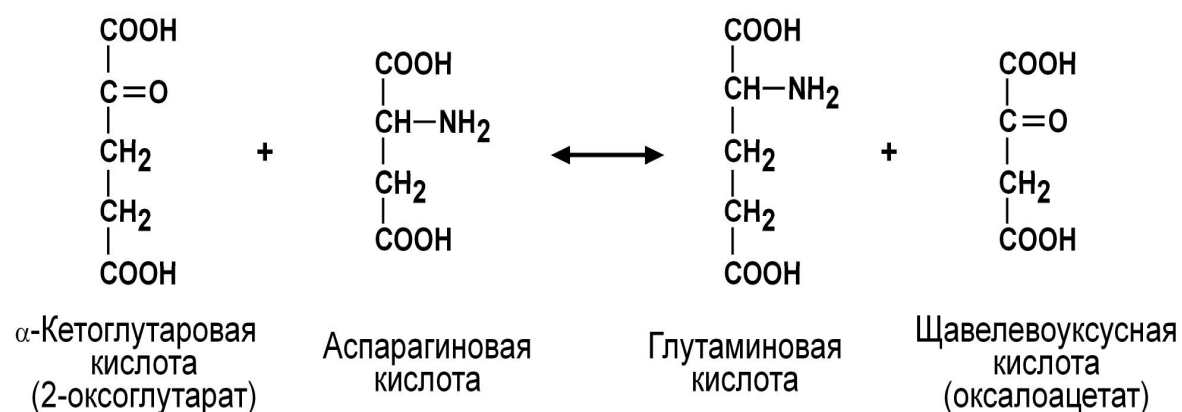
Пример 1



Характеристика фермента

Систематическое название	АТФ:D-гексоза-6-фосфо- трансфераза
Рабочее название	Гексокиназа
Класс	2. Трансферазы
Подкласс	2.7. Переносящие фосфорсодер- жащие группы
Подподкласс	2.7.1. Со спиртовой группой в ка- честве акцептора
Классификационный номер	КФ 2.7.1.1.
Кофактор	Магний

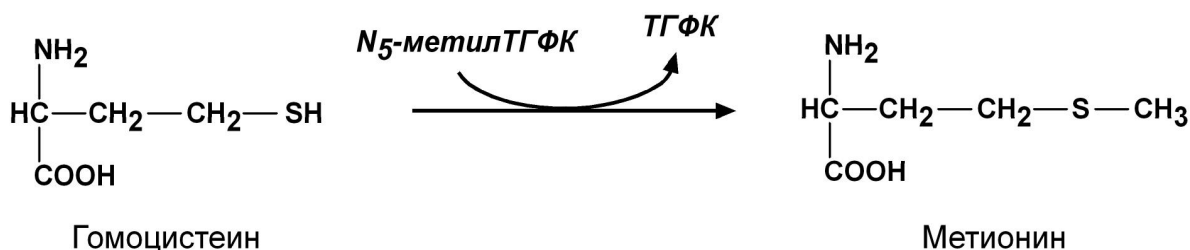
Пример 2



Характеристика фермента

Систематическое название	L-Аспартат:2-оксоглутарат- аминотрансфераза
Рабочее название	Аспартатаминотрансфераза
Класс	2. Трансферазы

Подкласс	2.6. Переносящие азотсодержащие группы
Подподкласс	2.6.1. Аминотрансферазы
Классификационный номер	КФ 2.6.1.1.
Кофермент	Пиридоксальфосфат
Пример 3	



	Характеристика фермента
Систематическое название	5-метилтетрагидрофолат:L-гомоцистеин S-метилтрансфераза
Рабочее название	Метионинсинтаза
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 — ферменты, осуществляющие разрыв внутримолекулярных связей в субстрате (за исключением С-С связей) путем присоединения элементов H_2O . Подразделяется на 13 подклассов. Ввиду сложности многих субстратов у ряда ферментов сохранены тривиальные названия: пепсин, трипсин. Коферменты отсутствуют.

Гидролазы сосредоточены в основном в желудочно-кишечном тракте и в лизосомах клеток тканей. Осуществляют распад макромолекул, образуя легко адсорбируемые мономеры. В **подклассы** выделяются группы ферментов, катализирующие 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.).

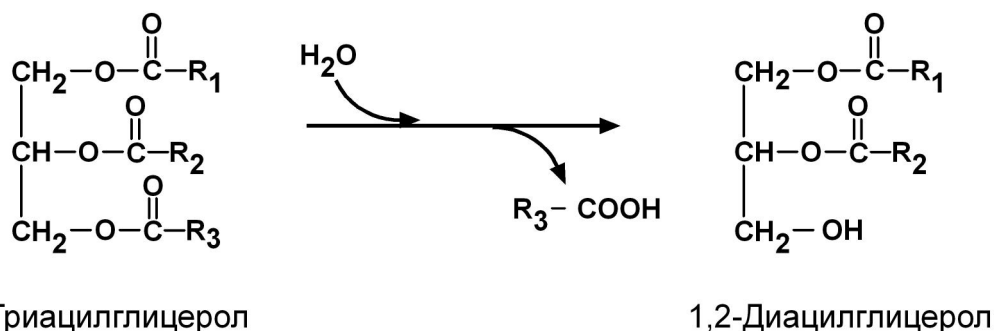
Наиболее часто встречаются следующие гидролазы:

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:

Гидролизуемый субстрат : отделяемая группа гидролаза

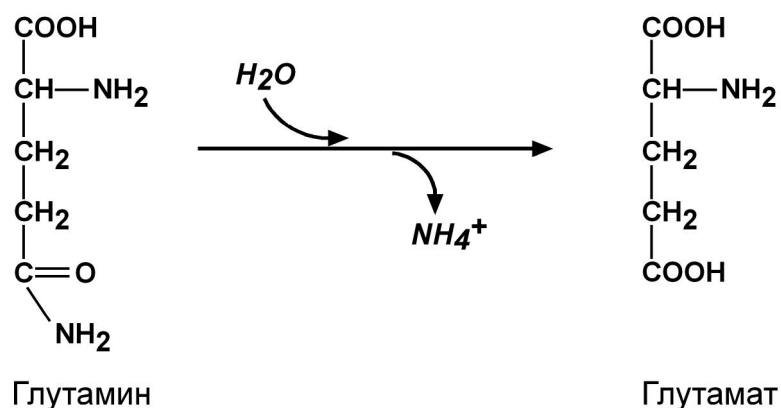
Пример 1



Характеристика фермента

Систематическое название	Триацилглицерол:ацилгидролаза
Рабочее название	ТАГ-липаза
Класс	3. Гидролазы
Подкласс	3.1. Действующие на сложные эфиры
Подподкласс	3.1.1. Гидролазы карбоновых кислот
Классификационный номер	КФ 3.1.1.3.

Пример 2



Характеристика фермента

Систематическое название	L-глутамин:амидгидролаза
Рабочее название	Глутаминаза
Класс	3. Гидролазы

Подкласс

3.5. Действующие на связи углерод-азот (непептидные)

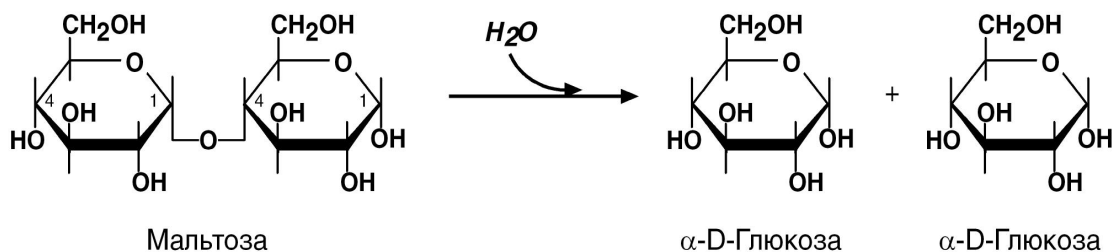
Подподкласс

3.5.1. Действующие в линейных амидах

Классификационный номер

КФ 3.5.1.2.

Пример 3



Характеристика фермента

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 — ферменты, катализирующие разрыв C—O, C—C, C—N и других связей, а также *обратимые* реакции отщепления различных групп субстратов не гидролитическим путем. Выделяют 7 подклассов. Эти реакции сопровождаются образованием двойной связи или присоединением групп к месту двойной связи. Класс насчитывает около 230 ферментов. Лиазы – сложные ферменты, коферментами служат пиридоксальфосфат, тиаминдифосфат, магний, кобальт.

В **подклассы** выделяются ферменты в зависимости от природы разрываемой связи:

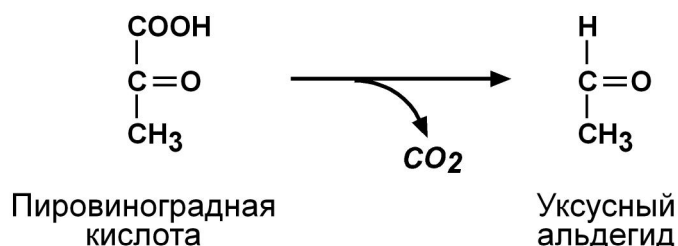
- 4.1. углерод-углерод лиазы;
- 4.2. углерод-кислород лиазы;
- 4.3. углерод-азот лиазы;
- 4.4. углерод-сера лиазы;
- 4.5. фосфор-кислород лиазы.

Среди **подподклассов** выделяют, например, карбоксилиазы (4.1.1.), гидролиазы 4.2.1.).

Систематическое название лиаз образуется:

Расщепляемый субстрат : отделяемая группа – лиаза

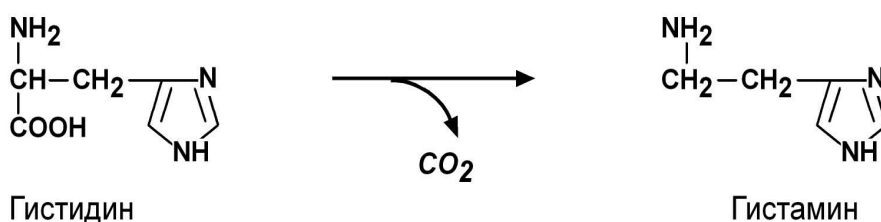
Пример 1



Характеристика фермента

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

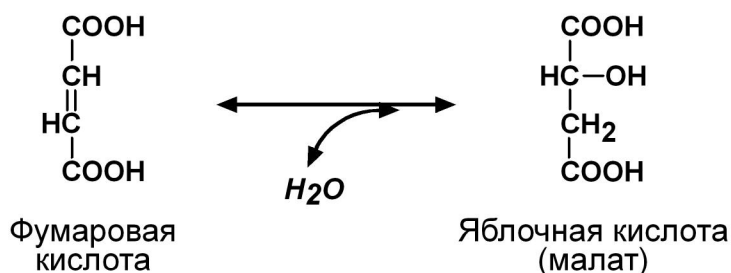
Пример 2



Характеристика фермента

Систематическое название	Гистидин:карбоксилиаза
Рабочее название	Гистидин-декарбоксилаза
Класс	4. Лиазы
Подкласс	4.1. Углерод-кислород лиазы
Подподкласс	4.1.1. Карбоксилиазы
Классификационный номер	КФ 4.1.1.22.
Кофермент	Пиридоксальфосфат

Пример 3

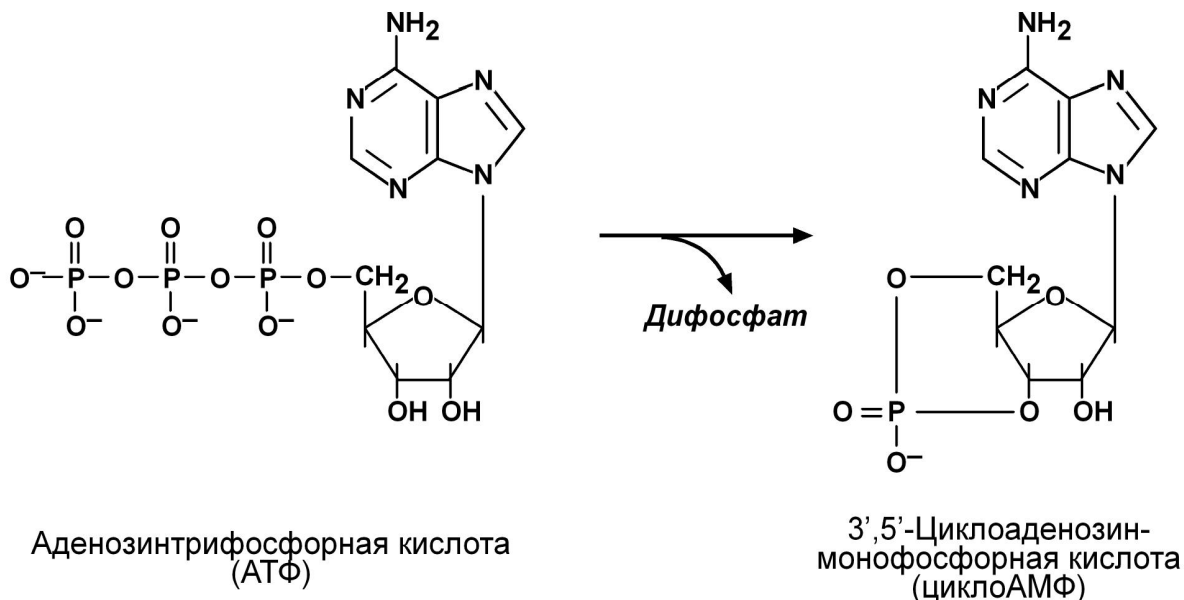


Характеристика фермента

Систематическое название	(S)-Малат:гидролиаза
Рабочее название	Фумараза

Класс
 Подкласс
 Подподкласс
 Классификационный номер
Пример 4

4. Лиазы
 4.2. Углерод-кислород лиазы
 4.2.1. Гидролиазы
 КФ 4.2.1.2.



Характеристика фермента

Систематическое название	АТФ:дифосфат лиаза (циклизующая)
Рабочее название	Аденилатциклаза
Класс	4. Лиазы
Подкласс	4.6. Фосфор-кислород лиазы
Подподкласс	4.6.1. Фосфор-кислород лиазы
Классификационный номер	КФ 4.6.1.1.

V КЛАСС. ИЗОМЕРАЗЫ

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

Изомеразы делятся по типу изомеризации на:

5.1. Рацемазы и эпимеразы.

Рацемазы отвечают за взаимопревращения L- и D-изомеров, S- и R-изомеров. Эпимеразы изменяют конфигурацию при одном из хиральных атомов углерода, например: взаимопревращение α - и β -изомеров, превращения рибулоза \leftrightarrow ксилулоза, галактоза \leftrightarrow глюкоза, манноза \leftrightarrow галактоза.

5.2. Цис-транс изомеразы.

5.3. Внутримолекулярные оксидоредуктазы.

5.4. Внутримолекулярные трансферазы – мутазы, осуществляют перенос химических групп внутри молекулы.

5.5. Внутримолекулярные лиазы.

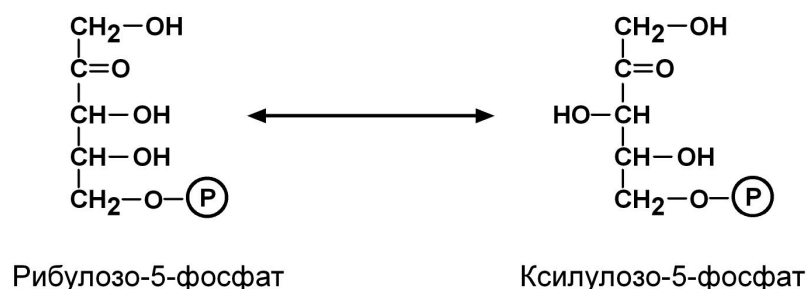
Среди подподклассов выделяют, например: действующие на аминокислоты и их производные (5.1.1.), на углеводы и их производные (5.1.3.), перемещающие двойные (C=C) связи (5.3.3.).

Систематическое название изомераз образуется:

Субстрат – [] – реакция,

где [] – обозначение, отражающее суть реакции, например, "номер изменяемого атома углерода", изменение "цистранс", изменение "кето-енол", изменение "альдозо-кетозо".

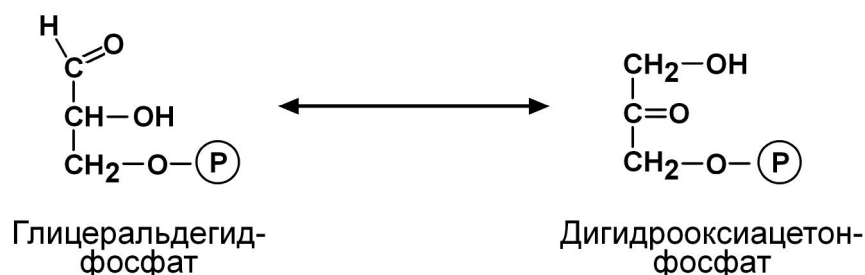
Пример 1



Характеристика фермента

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. Действующие на углеводы и их производные
Классификационный номер	5.1.3.1.

Пример 2



Характеристика фермента

Систематическое название	D-глицеральдегид-3-фосфат-альдозо-кетозо-изомеразы
Рабочее название	Триозофосфат-изомеразы
Класс	5. Изомеразы
Подкласс	5.3. Внутримолекулярные оксидо-

Подподкласс

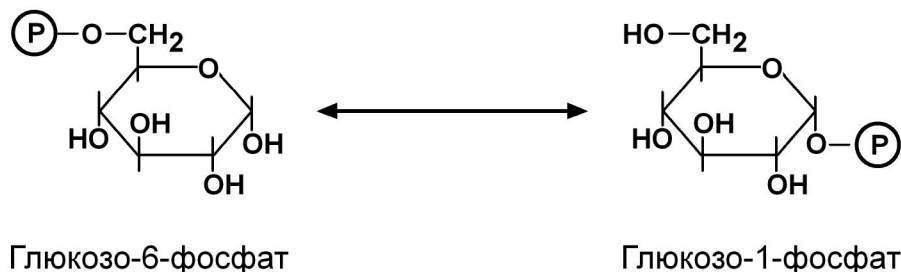
Классификационный номер

Пример 3

редуктазы

5.3.1. Катализирующие взаимопре-
вращения альдоз и кетоз

КФ 5.3.1.1.



Характеристика фермента

Систематическое название

α -D-глюкозо-1,6-фосфомутаза

Рабочее название

Фосфоглюкомутаза

Класс

5. Изомеразы

Подкласс

5.4. Внутримолекулярные трансфе-
разы

Подподкласс

5.4.2. Фосфотрансферазы

Классификационный номер

КФ 5.4.2.2.

Кофермент

Глюкозо-1,6-дифосфат

VI КЛАСС. ЛИГАЗЫ

Лигазы (синтетазы) — ферменты, катализирующие присоеди-
нение друг к другу двух молекул с использованием энергии
высокоэнергетических связей АТФ (или других макроэргов). Ли-
газы — сложные ферменты, содержат нуклеотидные, биотино-
вые, 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.

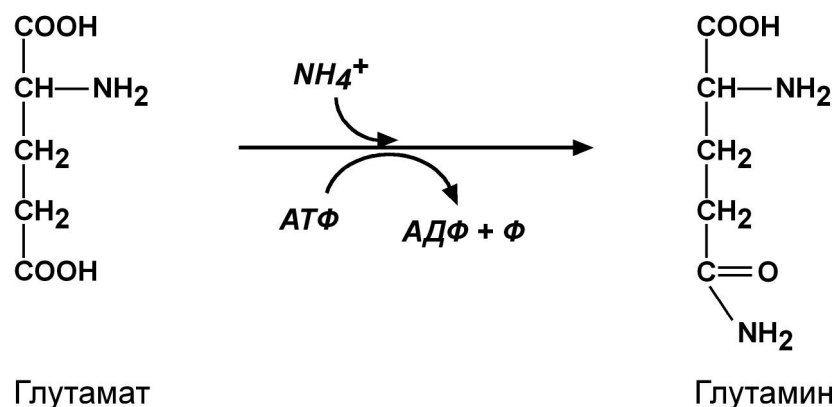
6.6. Азот-металл.

Среди подподклассов выделяют, например: образующие
связи аминоксил-тРНК (6.1.1.), синтезирующие соединения ки-
слота-тиол (6.2.1.), амиды (6.3.1.).

Систематическое название фермента:

Субстрат 1 : субстрат 2 - лигаза

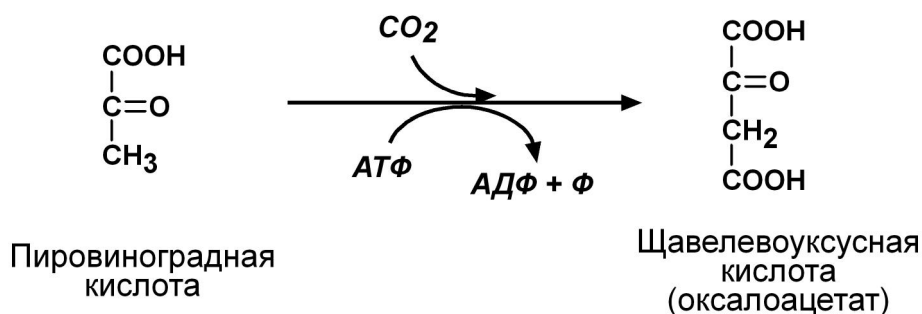
Пример 1



Характеристика фермента

Систематическое название	L-глутамат:аммиак-лигаза
Рабочее название	Глутаминсинтетаза
Класс	6. Лигазы
Подкласс	6.3. Образующие связи углерод-азот
Подподкласс	6.3.1. Амид-синтетазы
Классификационный номер	КФ 6.3.1.2.

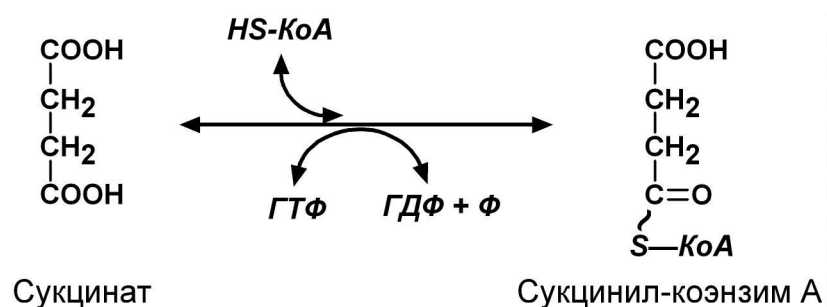
Пример 2



Характеристика фермента

Систематическое название	Пируват:карбоксилигаза (АДФ-образующая)
Рабочее название	Пируваткарбоксилаза
Класс	6. Лигазы
Подкласс	6.4. Образующие связи углерод-углерод
Подподкласс	6.4.1. Образующие связи углерод-углерод
Классификационный номер	КФ 6.4.1.1.
Кофакторы	Биотин. Магний. Цинк.

Пример 3



Характеристика фермента

Систематическое название	Сукцинат:КоА-лигаза
Рабочее название	Сукцинил-КоА-синтетаза Сукцинат-тиокиназа
Класс	6. Лигазы
Подкласс	6.2. Образующие связи углерод-сера
Подподкласс	6.2.1. Лигазы кислота-тиол
Классификационный номер	6.2.1.4.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ БЕЛКИ ПЛАЗМЫ КРОВИ

Фракции белков	Основные представители белковых фракций	Белки острой фазы
Альбумины	Пре- и постальбумины. Альбумин	
α_1	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
Глобулины	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 н Гаптоглобин Церулоплазмин
β	β_1 А-глобулин β -Липопротеин β_1 В-глобулин Трансферрин Плазминоген Проконвертин Фибриноген Компоненты комплемента С ₁ -С ₄ , С ₉ Гемопексин	Трансферрин Компоненты комплемента С ₁ -С ₄ , С ₉
γ	G-иммуноглобулин А-иммуноглобулин D-иммуноглобулин E- 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 высокие количества углеводов. Белок имеет высокое сродство к полианионам (например, к гепарину) и, вероятно, регулирует количество свободного гепарина в плазме. α_1 -Гликопротеин связывает лекарства (например, пропранолол и лидокаин), стероиды (прогестерон, тестостерон). Синтезируется в печени.

Нормальные величины

Сыворотка 0,55-1,40 г/л

Клинико-диагностическое значение

Повышение уровня белка в крови отмечается при острых и хронических воспалительных процессах, ревматоидном артрите, злокачественных опухолях, лихорадочных состояниях, травмах, инфаркте миокарда, физической нагрузке, беременности, нефротическом синдроме.

α_1 -Антитрипсин

α_1 -Антитрипсин – гликопротеин, образуется в печени, белок острой фазы, является ингибитором протеиназ (трипсина, химотрипсина, калликреина, плазмина) и обуславливает 92-94% от общей антипротеолитической функции крови. Аутосомно-рецессивно наследуемый недостаток его в крови является одним из факторов патогенеза эмфиземы легких, бронхоэктазий и хронического бронхита, ранних циррозов печени. Очевидно, что отсутствие ингибитора приводит к неограниченному протеолиту 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), представляет собой слабый специфический ингибитор 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

C-реактивный белок

C-реактивный белок (СРБ) по происхождению является мезанхимальным белком, который подвергся частичной денатурации вследствие распада тканей при воспалительных и деструктивных процессах. Он принимает участие 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, комплексируясь с белковыми и небелковыми веществами, появляющимися при распаде клеток; является естественным ингибитором катепсина В; участвует в транспорте витамина В₁₂. Гаптоглобин в низких концентрациях присутствует во многих жидкостях организма: ликворе, лимфе, синовиальной жидкости, желчи.

Нормальные величины

Сыворотка крови 0,8-2,7 г/л

Клинико-диагностическое значение

Концентрация белка неспецифически повышается в ответ на повреждение ткани, воспаление, опухолевый процесс (осо-

бенно с метастазами). Высокие показатели наблюдаются при сахарном диабете, нефротическом синдроме, пиелонефрите, ожогах, острых и хронических воспалительных состояниях, некрозе тканей, инфаркте миокарда, активных аутоиммунных заболеваниях, системных ревматоидных заболеваниях.

Снижение количества белка отмечено при поражении паренхимы печени, гемолитических анемиях. Уровень гаптоглобина считается чувствительным показателем гемолитических состояний: высвобождение гемоглобина вызывает снижение концентрации гаптоглобина.

α_2 -Макроглобулин

α_2 -Макроглобулин – высокомолекулярный цинксодержащий белок, состоит из 4 идентичных субъединиц и включает углеводный компонент, синтезируется в печени. Является ингибитором протеиназ (как свертывающей системы крови, так и других) — плазмина, пепсина, трипсина, химотрипсина, эндопептидаз, катепсина D, тромбина, калликреина. Транспортирует ферменты и гормоны, рецептор лимфоцитов, участвует во взаимодействии матери и плода, оказывает иммуномодулирующее действие, ингибитор компоненты комплемента.

Нормальные величины

Сыворотка крови	дети (1-3 года)	около 4,5 г/л
	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, как сывороточный антиоксидант ликвидирует супероксидные радикалы кислорода,

восстанавливает O_2 до воды и предотвращает окисление ненасыщенных жирных кислот.

Нормальные величины

Сыворотка 0,15-0,50 г/л

Клинико-диагностическое значение

Повышенные результаты определяются при ревматоидном артрите, системной красной волчанке, хронических воспалительных процессах, холестазах, гепатите, циррозе печени, инфаркте миокарда, острых инфекциях, злокачественных новообразованиях с метастазами, при меланоме, шизофрении

Уменьшение показателя выявлено при снижении синтеза 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 этого семейства, связывая ионы железа (III) и препятствуя их восстановлению, представляют собой важный компонент антиоксидантной защиты организма. Кроме этого, 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	дети	2,0-3,6 г/л
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	0,2-0,6 мг/л
крови	до 7,0 г/л
Женское молоко	

Клинико-диагностическое значение

Увеличение содержания белка в крови отмечается при беременности, гестозах, кожных заболеваниях, злокачественных новообразованиях ЖКТ.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

НОРМАЛЬНЫЕ 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	Дети	1,8-6,4 ммоль/л
	Взрослые	2,5-8,3 ммоль/л
Креатинин	Дети	
	до 1 года	18-35 мкмоль/л
	от 1 года до 12 лет	27-62 мкмоль/л
	Взрослые	
	женщины	44-97 мкмоль/л
	мужчины	52-132 мкмоль/л
Мочевая кислота		0,12-0,32 ммоль/л
	Мясная диета	0,16-0,45 ммоль/л
Белок общий	Дети	
	новорожденные	51-60 г/л
	дети до 1 года	51-73 г/л
	дети от 1 года до 3 лет	54-85 г/л
	старшие	65-85 г/л
	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/ α_1 + α_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	Дети	0-5	0,15-1,56 ммоль/л
		6-11	0,2-1,1 ммоль/л
		12-15	0,3-1,3 ммоль/л
		16-19	0,4-1,6 ммоль/л
		Взрослые	
		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	Дети	новорожденные
впоследствии			2,9-5,2 ммоль/л
Взрослые		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	Дети	100-140 г/л	
	Взрослые	женщины	120-140 г/л
		мужчины	130-160 г/л
Общий билирубин	Взрослые	3,4-17,1 мкмоль/л	
	Дети доношенные	кровь из пуповины	< 34,2 мкмоль
		возраст до 5 дней	< 205,2 мкмоль/л
		впоследствии	3,4-17,1 мкмоль/л
	Дети недоношенные	кровь из пуповины	< 34,2 мкмоль/л
	возраст до 5 дней	< 273,6 мкмоль/л	
Прямой билирубин	Дети	отсутствие	
	Взрослые	2,2-5,1 мкмоль/л	

Калий	Дети	новорожденные	3,7-5,9 ммоль/л
		до 2 лет	4,1-5,3 ммоль/л
		старше 2 лет	3,4-4,7 ммоль/л
	Взрослые	3,5-5,1 ммоль/л	
Натрий	Дети	новорожденные	134-146 ммоль/л

	дети	138-146 ммоль/л
	Взрослые	136-146 ммоль/л
Железо	Дети	
	новорожденные	17,9-44,8 мкмоль/л
	до 2 лет	7,1-17,9 мкмоль/л
	старше 2 лет	8,9-21,4 мкмоль/л
	Взрослые	
	мужчины	8,9-28,6 мкмоль/л
	женщины	7,1-26,8 мкмоль/л
Фосфаты	Дети	
	новорожденные	1,13-2,78 ммоль/л
	младшего возраста	1,45-2,16 ммоль/л
	школьного возраста	1,46-1,76 ммоль/л
	Взрослые	0,81–1,48 ммоль/л
Кальций		2,0-2,6 ммоль/л
Хлориды		97-108 ммоль/л

рН	Новорожденные	7,21-7,38
	Дети и взрослые	
	артериальная кровь	7,37-7,45
	венозная кровь	7,34-7,43
рСО ₂	Новорожденные и дети	27-41 мм рт.ст.
	Взрослые	
	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	Новорожденные	17-24 ммоль/л
	Дети	19-24 ммоль/л
	Взрослые	
	артериальная кровь	21-28 ммоль/л
	венозная кровь	22-29 ммоль/л
Остаточные анионы		12 ммоль/л
Избыток буферных оснований	Новорожденные	от -10 до -2 ммоль/л
	Дети до 2 лет	от -7 до +1 ммоль/л
	Дети	от -4 до -2 ммоль/л
	Взрослые	от -2 до +3 ммоль/л
рО ₂	Взрослые	83-108 мм рт.ст. или 11,04-14,36 кПа
Оксигемоглобин (HbO ₂)	Взрослые	94-97 %
Насыщение гемоглобина кислородом (HbO _{SAT} , SO ₂)	Новорожденные	40-90%
	Взрослые	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
Фосфаты		25,8-48,4 ммоль/сут
Кальций		2,5-7,5 ммоль/сут
Хлориды		120-240 ммоль/сут

Желудочный сок

Соляная кислота	Общая кислотность	40-60 ммоль/л
	Свободная HCl	20-40 ммоль/л
	Связанная HCl	10-20 ммоль/л

Клиренс эндогенного креатинина

	Мужчины	Женщины
Дети до 1 года	65 – 100 мл/мин	65-100 мл/мин
от 1 до 30 лет	88 – 146 мл/мин	81-134 мл/мин
Взрослые		
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

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

ЭТАЛОНЫ ОТВЕТОВ К ТЕСТОВЫМ ЗАДАНИЯМ

Строение, свойства и функции белков

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

Строение, классификация и роль витаминов

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

Энзимология

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

Биологическое окисление

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

Обмен аминокислот и белков

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

Строение и обмен пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов

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

Матричные биосинтезы

- | | |
|--------|--------|
| 1 – 2) | 6 – 1) |
| 2 – 1) | 7 – 1) |
| 3 – 3) | 8 – 2) |

4 – 2)

5 – 2)

9 – 1)

10 – 1)

Строение и обмен углеводов

1 – 3)

2 – 3)

3 – 2)

4 – 4)

5 – 3)

6 – 3)

7 – 3)

8 – 3)

9 – 1)

10 – 2)

Строение и обмен липидов

1 – 1)

2 – 3)

3 – 3)

4 – 2)

5 – 1)

6 – 1)

7 – 4)

8 – 2)

9 – 1)

10 – 4)

*Гормональная регуляция обмена веществ
и функций организма*

1 – 2)

2 – 3)

3 – 1)

4 – 4)

5 – 1)

6 – 3)

7 – 3)

8 – 1)

9 – 1)

10 – 1)

Биохимия крови

1 – 4)

2 – 1)

3 – 1)

4 – 1)

5 – 2)

6 – 3)

7 – 2)

8 – 1)

9 – 4)

10 – 2)

Биохимия почек и печени

1 – 3)

2 – 4)

3 – 4)

4 – 1)

5 – 2)

6 – 4)

7 – 1)

8 – 3)

9 – 4)

10 – 2)

ЭТАЛОНЫ ОТВЕТОВ К СИТУАЦИОННЫМ ЗАДАЧАМ

Строение, свойства и функции белков

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 насыщение сульфатом аммония до 100%-ного. Можно также внести в надосадочную жидкость реактивы, осаждающие белки любой природы (например, ТХУ, сульфосалициловую кислоту, соли тяжелых металлов) – появление осадка укажет на присутствие альбуминов.

2. При pH 3,0 к катоду, при pH 10,5 к аноду. В водном растворе заряд данного пептида отрицательный. При pH 3,0 он перезаряжается на положительный и в электрическом поле движется к катоду, а при pH 10,5 его отрицательный заряд усиливается и в электрическом поле он движется к аноду.

3. Белок: А – будет передвигаться к аноду; Б – при pH 5,0 – к катоду, при pH 7,0 – к аноду; В – при pH 5,0 – к катоду, 9,5 – останется на месте, 11,0 – к аноду.

4. 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. Первый пептид даст положительные биуретовую и нингидриновую реакции. Второй полипептид может участвовать в образовании солевых мостиков, так как в нем имеются свободная NH₂-группа лизина и COOH-группа глутаминовой кислоты.

Строение, классификация и роль витаминов

1. Пиридоксин участвует в переаминировании аминокислот. В первом случае происходит образование необходимых аминокислот из данных четырех, во втором случае это не столь необходимо.

2. Происходит конкурентное ингибирование микробных ферментов, ответственных за синтез фолиевой кислоты. В результате происходит нарушение синтеза бактериями собственного тетрагидрофолата. После лечения рекомендовано применение витаминов группы В и пробиотиков для восстановления микрофлоры.

3. Следует назначить витамин А, участвующий в регенерации тканей, витамин К для снижения вероятности кровотечений, витамин D для обеспечения организма кальцием.

Энзимология

1. При слабом нагревании происходит диссоциация олигомерного белка на субъединицы, что ликвидирует регуляторный

центр. В то же время активный центр может сохранять свою работоспособность.

2. Растворение сухого препарата дистиллированной водой гарантирует отсутствие примесей и тяжелых металлов, способных связаться с функциональными группами белка. Перемешивать осторожно необходимо, чтобы избежать механической денатурации. При низкой температуре гарантирована низкая активность возможно попавших в раствор бактерий, также достигается снижение риска спонтанного раскручивания цепи. Высушивание препарата и запаивание в вакуумированные ампулы защищает фермент от воздействия кислорода и предотвращает окисление серусодержащих групп.

3. 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 задачи известно, что гормон усиливает фосфорилирование ферментов, и поэтому логично предположить, что и липаза будет активироваться при фосфорилировании.

Биологическое окисление

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 P/O, 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 снижающий количество АТФ эффект будет проявляться в основном в клетках, имеющих много митохондрий, т.е. в нервных клетках, что проявится как нарушение деятельности нервной системы.

2. Низкий коэффициент P/O 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 P/O, является разобщение процессов окисления и

фосфорилирования. Его обеспечивает термогенин – белок митохондриальной мембраны бурых жировых клеток.

Обмен аминокислот и белков

1. Низкая кислотность желудочного сока, снижение активности пепсина способствуют развитию микрофлоры, развиваются процессы гниения, которые сопровождаются образованием сероводорода. Для нормализации переваривания можно рекомендовать соляную кислоту с пепсином или желудочный сок.

2. Глутаминовая кислота – дикарбоновая моноаминокислота – способна связывать аммиак, образуя нетоксичный глутамин. При переаминировании она превращается в кетоглутаровую кислоту – важный субстрат ЦТК, который при окислении образует 4 молекулы АТФ. Глутаминовая кислота оказывает антиоксидантный эффект, снижая содержание липоперекисей, повреждающих клеточные мембраны.

3. У больного снижена мочевинообразовательная функция печени, поэтому содержание мочевины в крови и экскреция ее с мочой уменьшены. Для проверки предположения целесообразно исследовать активность ферментов орнитинового цикла синтеза мочевины – орнитинкарбамоилтрансферазы и аргиназы.

Строение и обмен пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов

1. Высокая концентрация мочевой кислоты в моче обнаруживается при гиперурикемии любого генеза. У взрослых это бывает при подагре или потреблении пуриносодержащих продуктов. В данном случае имеется сильный дефект фермента гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы, ответственного за утилизацию пуриновых оснований – синдром Леша-Нихана. В результате образуется избыток мочевой кислоты.

2. Фолиевая кислота в своей активной форме N⁵,N¹⁰-метилтен-ТГФК участвует в синтезе тимидилмонофосфата (ТМФ), являющегося абсолютно необходимым для синтеза ДНК и, следовательно, для деления клеток. Из-за прекращения деления число эритроцитов сокращается (анемия), но их рост не останавливается (мегалобластическая), аналогично развивается лейкопения и тормозится деление клеток эпителия (слизистые и кожа).

Матричные биосинтезы

1. Серповидно-клеточная анемия, при которой имеет место замещение глутаминовой кислоты на валин в β-цепи Hb, в ДНК происходит замена ЦТТ на ЦАТ.

2. 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 эффект препарата.

3. Общеизвестно, что белки организма отличаются друг от друга по причине разной последовательности и количеству нуклеотидов в их генах (на уровне ДНК). В данном случае, поскольку ген один для обоих белков, отличие должно создаваться на другом уровне. В данном случае – на уровне процессинга мРНК. В энтероцитах в молекулу мРНК при процессинге вводится терминирующий кодон так, что рибосомальный синтез белка прекращается на "полпути" и образуется апоВ-48. В гепатоцитах процессинг мРНК не сопровождается подобными изменениями и происходит считывание мРНК целиком, синтезируется апоВ-100-белок.

Строение и обмен углеводов

1. Нет, уровень сахара в крови может повыситься вследствие стресс-реакции, для которой характерно увеличение уровня адреналина в крови и тканях.

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.

Строение и обмен липидов

1. При задержке попадания желчи в двенадцатиперстную кишку нарушается (угнетается) активация панкреатической липазы, ухудшаются переваривание жиров, всасывание жирных кислот и жирорастворимых витаминов, ухудшается моторная функция кишечника, развивается 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 O₂, тогда как на 1 г гликогена всего 829 мл. В энергетическом балансе метаболизма сердца ведущую роль играют более эффективные аэробные процессы, но они делают его очень чувствительным к гипоксии (кислородному голоданию), которая может явиться причиной ин-

фаркта, тогда как скелетная мышца активно работает и в условиях кислородной недостаточности.

3. Уменьшение углеводов в диете ребенка приводит к нарушению цепочки "Глюкоза → пируват → оксалоацетат" и замедление 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, развился метаболический ацидоз. Параллельно увеличение глюконеогенеза из аминокислот усилило процессы дезаминирования и накопление аммиака, но синтез мочевины тормозится из-за нехватки энергии АТФ при нарушении ЦТК – развивается гипераммониемия. Для назначения рационального лечения целесообразно определить содержание глюкозы и мочевины в крови, кетоновых тел в моче, исследовать состояние кислотно-щелочного равновесия.

Гормональная регуляция обмена веществ и функций организма

1. Замедление физического и умственного развития, снижение интенсивности процессов обмена характерно для гипофункции щитовидной 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.

3. Высокая утомляемость, частые гипогликемические состояния, повышенная пигментация кожи и другие симптомы характерны для первичной хронической недостаточности коры надпочечников (болезни Аддисона).

Биохимия крови

1. При обширных ожогах вследствие потери жидкости тканями, обезвоживания, отмечаются сгущение крови, гиперпротеинемия (100 г/л). При нарушении функции желудочно-кишечного тракта, снижении поступления в организм аминокислот развивается гипопропротеинемия (30 г/л).

2. Для уточнения диагноза необходимо дополнительно определить в крови содержание азота мочевины, который составляет в норме половину остаточного азота. При нарушении выделительной функции почек имеется повышение остаточного азота преимущественно за счет азота мочевины, при нарушении мочевинообразовательной функции печени доля азота мочевины падает.

3. Так как рН 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^- является отражением накопления и диссоциации угольной кислоты, и в первую очередь компенсационной реабсорбции карбонатов почками. На основании клинической картины подтверждается диагноз дыхательного ацидоза. Компенсация происходит через "метаболический алкалоз", т.е. выведение почками иона H^+ посредством активации аммониегенеза и ацидогенеза. Щелочной резерв соответствует сумме всех буферных оснований крови и повышен за счет избытка карбонат-ионов.

Биохимия почек и печени

1. Причиной увеличения выведения ионов Ca^{2+} с мочой может быть гиподинамический остеопороз – «вымывание» Ca^{2+} из костей в кровь и экскреция его в мочу.

2. У здорового человека белок в моче практически отсутствует (содержание его столь мало, что обычными методами не обнаруживается). Протеинурия может появиться при очень больших физических нагрузках – "маршевая", "холодовая" протеинурия.

3. Перечисленные симптомы характерны для механической (обтурационной) желтухи, вызванной, вероятно, закупоркой камнем общего желчного протока. В подобных случаях в крови повышается содержание билирубина в значительной степени за счет прямого (билирубинглюкуронида), так как отток желчи в кишечник нарушен. Поэтому кал бесцветен (ахолия), не содержит стеркобилина, следовательно, и моча не содержит стеркобилиногена и уробилиногена. Темный цвет мочи обусловлен проникновением в нее прямого билирубина из крови, также возможно пенообразование мочи из-за наличия желчных кислот.

4. В норме в печени происходит обезвреживание токсического индола, поступающего из кишечника. В реакции с фосфоаденозинфосфосульфатом (ФАФС) образуется менее токсичный индикан, выводящийся из организма с мочой. Увеличение содержания индола свидетельствует о нарушении обезвреживающей функции печени.

Учебное издание

**ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ ПО
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ**
для студентов
лечебного и педиатрического факультетов

Учебное пособие

Авторы

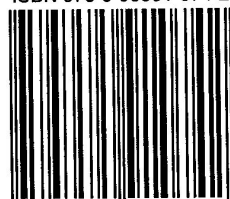
ТИМИН Олег Алексеевич
СТЕПОВАЯ Елена Алексеевна
ФЕДОРОВА Татьяна Сергеевна
НОСАРЕВА Ольга Леонидовна
СЕРЕБРОВ Владимир Юрьевич

Редакционно-издательский отдел СибГМУ
634050, г. Томск, пр. Ленина, 107
тел. 8(382-2) 51-41-53
E-mail: bulletin@bulletin.tomsk.ru

Подписано в печать 06.04.2012 г.
Формат 60x84 $\frac{1}{16}$. Бумага офсетная.
Печать ризограф. Гарнитура «Arial». Печ. лист. 15,87
Тираж 300 экз. Заказ №

Отпечатано в лаборатории оперативной полиграфии СибГМУ
634050, Томск, ул. Московский тракт, 2

ISBN 978-5-98591-074-2



9 785985 910742