

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

**Т.К. Климентьева, О.Е. Акбашева,
Д.И. Кузьменко**

ПРАКТИКУМ ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ

**для студентов
медико-биологического факультета**

Издание 3-е переработанное и дополненное

Учебное пособие

Томск
Издательство СибГМУ
2019

УДК 577.1(075.8)
ББК 52.57я73
К 492

Климентьева, Т.К. Практикум по биологической химии
К 492 для студентов медико-биологического факультета: учебное пособие /Т.К. Климентьева, О.Е. Акбашева, Д.И. Кузьменко. – 3-е изд., перераб. и доп. – Томск: Изд-во СибГМУ, 2019. – 193 с.

Практикум адаптирован к программе обучения и плану практических занятий по общей биохимии в объеме двух семестров. Материал разбит на крупные блоки, к которым даны обоснования актуальности и цели изучения соответствующих тем, позволяющих сформировать необходимые компетенции врачей-биохимиков, биофизиков и кибернетиков.

В пособие включено большое количество оригинальных задач и вопросов для самоконтроля знаний, составленных преподавателями кафедры и заимствованных из «Сборника тестов и задач» под редакцией академика И.П. Самарина, учебника Д. Нельсона и М. Кокса «Основы биохимии Ленинджера».

Для лучшего усвоения знаний в качестве самостоятельной работы предлагаются домашние задания, примерные темы реферативных сообщений, расширяющие объем обязательных знаний. Перечень экзаменационных вопросов ориентирует студентов на структуру и объем изучаемого курса.

Учебное пособие подготовлено в соответствии с Федеральным государственным образовательным стандартом высшего образования по специальностям: 30.05.01 – Медицинская биохимия, 30.05.02 – Медицинская биофизика и 30.05.03 – Медицинская кибернетика.

УДК 577.1(075.8)
ББК 52.57я73

Рецензент:

Мильто И.В. – доктор биологических наук, профессор кафедры морфологии медико-биологического факультета ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава РФ.

Утверждено и рекомендовано к печати Учебно-методической комиссией медико-биологического факультета ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава РФ (протокол № 2 от 18.04.2018 г.).

© Издательство СибГМУ, 2019
©Т.К. Климентьева, О.Е. Акбашева, Д.И. Кузьменко, 2019

ВВЕДЕНИЕ

«Люди, извлекающие наибольшее наслаждение из любимого предмета, могут, по всей вероятности, максимально обогатить и развить этот предмет».

Дж. Б.С. Холдейн

«Опыт – вот что важно!»

Г.К. Лихтенберг

«Думаю, что все сколько-нибудь ценное, чему я научился, приобретено мною путем самообразования».

Ч. Дарвин

«Красота научной работы состоит, главным образом, в красоте исследовательских приемов, в новизне и скрупулезности научной методики».

Д.С. Лихачев

Биохимия – обширная фундаментальная наука, которая состоит из самостоятельных разделов: общая биохимия, молекулярная биология, биоэнергетика, энзимология, медицинская биохимия и т. д. Наука, которая изучает молекулярные основы жизнедеятельности. Только биохимические методы исследования позволяют не просто зафиксировать так называемый «структурный след» – изменение внешнего вида ткани и клеток, изменение количества клеток, хромосом и т. п., а дают возможность ответить на вопрос «почему», «каким образом», «в результате чего изменилось состояние метаболизма клетки, строение мембран, активность ферментов» и т. д.

В курсе общей биохимии изучается «азбука» этой науки. За короткий срок Вы должны освоить основные понятия, которыми оперируют в биохимии: внешний и промежуточный обмен веществ, структура ферментов, главные принципы регуляции активности ферментов и метаболизма в целом, специфические пути обмена углеводов, липидов и белков, их взаимосвязь и общие пути катаболизма – цикл трикарбоновых кислот и окислительное фосфорилирование.

Методическое пособие предназначено для подготовки к лабораторным занятиям, семинарам и коллоквиумам по общей биохимии студентами медико-биологического факультета.

Большой акцент в практикуме сделан на освоение основных методов разделения и количественного определения различных

веществ, поскольку в процессе отработки этих задач происходит овладение конкретным методом, приобретается навык грамотного «прочтения» любой предложенной методики.

Студенты, обучающиеся по специальности «Медицинская биохимия» после общего курса, изложенного в практикуме, далее будут подробно изучать медицинскую биохимию, молекулярную биологию, биотехнологию, углубляя теоретические знания и получая дополнительные практические навыки.

Студенты, обучающиеся по специальностям «Медицинская биофизика и медицинская кибернетика», кроме этого получают представление о клинической биохимии, овладеют простейшими навыками практической работы в биохимической лаборатории.

Некоторые лабораторные работы, такие как разделение веществ методом гель-фильтрации, электрофореза, а также некоторые методы, имеющие большую клинико-диагностическую значимость, предназначены для студентов-биофизиков и студентов-кибернетиков. Студенты-биохимики будут изучать эти методы более подробно в других разделах.

В каждом разделе практикума изложена актуальность изучаемой темы, цели и задачи, даны вопросы для самоконтроля знаний, тестовые задания и ситуационные задачи, а также принципы и методические подходы выполнения лабораторных работ. Кроме того для самостоятельной работы студентов разработаны практические задания и даны примерные темы реферативных докладов, вопросы к семинарам и коллоквиумам.

В большинстве лабораторных работ используются наборы реагентов: «Вектор-Бест» (Новосибирск), «Ольвекс» и «Абрис+» (С-Петербург), «Лахема» (Чехия), либо других фирм.

ПРАКТИЧЕСКИЕ НАВЫКИ

В процессе изучения курса «Общая биохимия» студент должен усвоить основные правила работы в биохимической лаборатории:

- Знать технику безопасности работы в лаборатории.
- Изучить правила использования лабораторной посуды и оборудования.

1. Ознакомиться с общими принципами биохимических исследований:

- получение биологического материала (гомогенат ткани);
- выделение, очистка и идентификация белковых и липидных фракций;
- назначение буферных растворов и требования к ним;
- определение активности ферментов;

- количественное определение концентрации веществ в исследуемом материале: приготовление эталонных растворов, построение калибровочных графиков.

2. Овладеть практическими навыками:

- расчет концентрации, приготовление и хранение реактивов;
- центрифугирование;
- фотоколориметрия и спектрофотометрия;
- электрофорез;
- хроматография.

3. Выполнить лабораторные работы:

- качественные реакции на аминокислоты и белки;
- распределительная хроматография аминокислот;
- исследование общих свойств белка (высаливание, химическая и физическая денатурация, диализ);
- количественное определение белка;
- исследование общих свойств ферментов (оптимум pH, температуры, специфичность к субстрату, чувствительность к активаторам и ингибиторам);
- определение активности ферментов;
- выделение липидных фракций
- определение концентрации общих липидов и их фракций в сыворотке крови;
- выделение нуклеиновых кислот, определение чистоты и нативности ДНК;
- определение количества нуклеиновых кислот в биоматериале;
- определение концентрации глюкозы, мочевины, мочевой кислоты, холестерина;
- выделение гликогена и определение содержания в разных тканях;
- влияние гормонов на содержание глюкозы в крови.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

2,4-ДНФГ	– динитрофенилгидразин
4-ААП	– 4-аминоантипирин
HS~КоА	– коэнзим А
АДФ	– аденозиндифосфорная кислота
АЛТ	– аланинаминотрансфераза
АСТ	– аспартатаминотрансфераза
АТФ	– аденозинтрифосфорная кислота
ГМГ	– гидроксиметилглутарил
ГТФ	– гуанозинтрифосфорная кислота
ДНФГ	– 2,4-динитрофенилгидразин
ДЦКД	– дициклогексилкарбодиимид
ИФА	– иммуноферментный анализ
ИЭТ	– изоэлектрическая точка белка
КМЦ	– карбоксиметилцеллюлозная
ЛПВП	– липопротеины высокой плотности
ЛПНП	– липопротеины низкой плотности
ЛПОНП	– липопротеины очень низкой плотности
НАД⁺	– никотинамидадениндинуклеотид окисленный
НАДФ⁺	– никотинамиддинуклеотидфосфат окисленный
ПВК	– пировиноградная кислота
ПДК	– пируватдегидрогеназный комплекс
РЭС	– ретикуло-эндотелиальная система
СФ	– спектрофотометр
ТАГ	– триацилглицерол
ТПФ	– тиаминпирофосфат
ТХУ	– трихлоруксусная кислота
ТХУ	– трихлоруксусная кислота
УФ	– ультрафиолет
ФАД	– флавинадениндинуклеотид окисленный
ФМН	– флавинмононуклеотид
ФЭК	– фотоэлектроколориметр
ХМ	– хиломикроны
цАМФ	– циклический аденозинмонофосфат
ЦПЭ	– цепь переноса электронов
ЦТК	– цикл трикарбоновых кислот
ЭДТА	– этилендиаминтетрауксусная кислота

ПРИМЕРНЫЕ ЭКЗАМЕНАЦИОННЫЕ ВОПРОСЫ ПО КУРСУ «ОБЩАЯ БИОХИМИЯ»

1. Предмет биохимии. Статическая, динамическая, функциональная биохимия. Клиническая биохимия.
2. История развития биохимии. Отечественные и мировые биохимические школы.
3. Функции белков в организме. Классификация белков по химическому строению, форме молекулы, функциональным признакам.
4. Классификация аминокислот по химической структуре, физическим свойствам, биологическому значению. Физико-химические свойства аминокислот.
5. Первичные структуры белков, связи их стабилизирующие. Методы расшифровки первичной структуры белка.
6. Вторичные структуры белков, связи их стабилизирующие. Факторы, нарушающие α -спирализацию.
7. Третичная и четвертичная структуры белка, связи их стабилизирующие. Примеры белков с третичной и четвертичной структурой.
8. Свойства белковых растворов. Факторы, влияющие на растворимость белков. Способы осаждения белков.
9. Способы выделения, очистки и идентификации белков.
10. Внешний обмен белков и внутриклеточный протеолиз.
11. Процессы «гниения» белков в толстом кишечнике. Обезвреживание продуктов гниения.
12. Внутриклеточный обмен аминокислот (дезаминирование, переаминирование, декарбоксилирование).
13. Образование аммиака в организме. Механизм токсичности.
14. Пути обезвреживания аммиака в организме (синтез амидов, пуриновых оснований, аммиогенез, креатинина, орнитиновый цикл синтеза мочевины).
15. Пути метаболизма аминокислот в организме.
16. Протамины и гистоны. Структура, свойства, функции.
17. Альбумины и глобулины. Структура, свойства, функции.
18. Нуклеопротеины. Структура, свойства, функции.
19. Липопротеины. Структура, свойства, функции.
20. Витамины. Классификация, роль в обмене веществ. Механизм авитаминоза и гиповитаминоза.
21. Жирорастворимые витамины, роль в жизнедеятельности.
22. Витамины В₁ и В₆.
23. Витамины В₂ и РР.
24. Витамины Н (биотин) и В₃ (пантотеновая кислота).

25. Витамин С и фолиевая кислота.
26. Витаминоподобные соединения.
27. История учения о ферментах. Природа ферментов, их классификация. Сходство и различие биологических и химических катализаторов.
28. Механизм действия ферментов, образование фермент-субстратного комплекса.
29. Кинетика ферментативных реакций. Уравнение Михаэлиса–Ментен, Лайнуивера–Берка.
30. Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры, рН среды, концентрации фермента и субстрата.
31. Специфичность действия ферментов (абсолютная специфичность, стереоспецифичность, групповая, относительная специфичность).
32. Теории, объясняющие каталитическую эффективность (теория промежуточного комплекса, индуцированной подгонки, напряженной конфигурации).
33. Кислотно-основной катализ. Ковалентный катализ.
34. Ингибирование ферментов (необратимое ингибирование, примеры, механизм).
35. Обратимое ингибирование. Конкурентное, неконкурентное, бесконкурентное, субстратное.
36. Регуляция ферментативной активности. Мультиферментные системы.
37. Аллостерические ферменты. Механизм действия, структура. Гетеротропные ферменты. Кооперативный эффект.
38. Регуляция активности путем ковалентной модификации. Активация зимогенов.
39. Изоферменты.
40. Внешний обмен углеводов. Механизм всасывания сахаров в кишечнике.
41. Метаболическая судьба глюкозы. Роль фосфорилирования в метаболизме сахаров.
42. Гликолиз. Биологическое значение. Энергетическая ценность окисления глюкозы в анаэробных и аэробных условиях.
43. Ключевые ферменты гликолиза. Обратимость реакций гликолиза.
44. Конечные продукты гликолиза. Цикл Кори.
45. Глюконеогенез (предшественники, особенности в разных тканях).
46. Синтез и мобилизация гликогена. Гормональная регуляция.
47. Пентозофосфатный путь превращения глюкозы. Биологическое значение.
48. Механизм реакций субстратного фосфорилирования в гликолизе.

49. Механизм окислительного декарбоксилирования пирувата. Метаболические превращения ацетил-КоА.
50. ЦТК. Биологическое значение. Характеристика процесса. Анаплеротические реакции.
51. Частные реакции ЦТК. Энергетический баланс ЦТК. Механизм субстратного фосфорилирования в ЦТК.
52. Функции углеводов в организме. Важнейшие представители гомо- и гетерополисахаридов (крахмал, гликоген, гиалуроновая кислота, гепарин).
53. Внешний обмен нуклеопротеинов. Катаболизм пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Конечные продукты обмена.
54. Биосинтез пиримидиновых нуклеотидов. Роль фолиевой кислоты. Регуляция синтеза.
55. Биосинтез пуриновых нуклеотидов. Регуляция синтеза.
56. Структура ДНК. Первичная, вторичная, третичная. Физико-химические свойства ДНК.
57. Структура РНК. Типы РНК в клетке.
58. Биосинтез ДНК (репликация). Принцип построения двойной спирали ДНК. Опыты Мезельсон и Сталя. Ферменты процесса биосинтеза ДНК (ДНК-праймаза, ДНК-полимераза, ДНК-лигаза).
59. Биосинтез РНК (транскрипция). Ферменты, катализирующие этот процесс.
60. Биосинтез белка (трансляция). Матричный принцип. Принцип комплементарности и коллинеарности.
61. Этапы биосинтеза белка: активация, отбор аминокислот, инициация синтеза, элонгация полипептидной цепи, терминация.
62. Биологическое окисление. Общая схема. Значение. Окислительное фосфорилирование, его характеристика.
63. Структура дыхательной цепи, ферменты дыхательной цепи, пункты фосфорилирования.
64. АТФ-синтетаза, характеристика ферментного комплекса, факторы сопряжения, локализация. Адениннуклеотидтранслоказа, фосфаттранслоказа.
65. Гипотезы сопряжения окисления и фосфорилирования (химического сопряжения, конформационная гипотеза).
66. Хемосмотическая гипотеза. Электрохимический протонный градиент. Процессы, на которые расходуется энергия протонного градиента.
67. Разобщители транспорта электронов и синтеза АТФ. Природные разобщители. Ингибиторы дыхания.
68. Липиды: классификация, структура, функции.
69. Внешний обмен липидов. Соли желчных кислот. Всасывание продуктов переваривания липидов.

70. Промежуточный обмен липидов. β -окисление жирных кислот. Окисление жирных ненасыщенных кислот. Регуляция окисления жирных кислот.
71. Метаболизм кетоновых тел.
72. Биосинтез липидов. Челночные механизмы. Биосинтез жирных кислот. Удлинение молекул жирных кислот. Регуляция процесса.
73. Распад и синтез триацилглицеролов.
74. Биосинтез холестерина. Роль в организме.
75. Метаболическая судьба глицерина.
76. Гормоны: классификация по химической структуре и механизму действия.
77. Рилизинг-факторы гипоталамуса и гормоны гипофиза.
78. Гормоны щитовидной и паращитовидной желез.
79. Гормоны поджелудочной железы.
80. Гормоны коры надпочечников и половые стероиды.
81. Катехоламины. Биосинтез и распад. Биологические эффекты и механизм действия.
82. Взаимосвязь белкового и углеводного обмена веществ.
83. Взаимосвязь липидного и углеводного обмена веществ.

РАЗДЕЛ 1

ПРЕДМЕТ БИОХИМИИ. ЗАДАЧИ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

ТЕМА 1.1. ПРАВИЛА РАБОТЫ В БИОХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ. ХИМИЧЕСКАЯ ПОСУДА И ОБОРУДОВАНИЕ

Актуальность

Работа в биохимической лаборатории неизбежно связана с потенциально опасными и вредными факторами, в связи с чем на вводном занятии к курсу общей биохимии проводится инструктаж студентов по технике безопасности.

Цель

Усвоение правил техники безопасности и назначения лабораторной посуды и оборудования, практическое освоение порядка работы на фотоэлектроколориметре и спектрофотометре, приобретение навыков работы со стеклянными и автоматическими пипетками.

Необходимо напомнить навыки пожарной и химической безопасности, полученные ранее (работа с кислотами, щелочами, органическими растворителями).

В ходе выполнения лабораторных работ студенты закрепляют теоретические знания, получают простейшие навыки практической работы в лаборатории, а именно:

1. Отмеривать точное количество жидкостей с помощью цилиндров, мензурок, колб, стеклянных и автоматических пипеток.
2. Проводить осаждение веществ из растворов (центрифугирование, денатурация, высаливание).
3. Фильтровать.
4. Отбирать надосадочную фракцию пипеткой, водоструйным насосом.
5. Пользоваться спиртовкой, водяной баней, водяным и суховоздушным термостатом.
6. Рассчитывать процентную, молярную и нормальную концентрации растворов и разведения концентрированных растворов.
7. Строить калибровочные графики зависимости экстинкции раствора от концентрации растворенного вещества.
8. Знать правила мытья, сушки, хранения химической посуды.

Некоторые навыки и правила работы студенты будут дополнительно осваивать на летней производственной лаборантской практике.

Правила работы в биохимической лаборатории

К работе в биохимической лаборатории допускаются студенты, усвоившие правила техники безопасности работы с едкими, токсичными и легковоспламеняющимися неорганическими и органическими веществами:

1. В целях личной безопасности студенты должны иметь спецодежду (медицинский халат с длинными рукавами).
2. К выполнению практической работе допускаются студенты, успешно сдавшие теоретическую часть, продемонстрировавшие преподавателю, что все этапы данной работы понятны и не вызывают никаких сомнений.
3. Работа должна производиться на своем рабочем месте. Все манипуляции с реактивами проводятся только на столе. Со стола должны быть убраны все лишние вещи, препятствующие своевременному устранению последствий возможной аварии.
4. Все пробирки должны быть подписаны и находиться в штативе. Работа с химическими реактивами должна производиться только с помощью стеклянных, либо автоматических пипеток.
5. Любые процедуры с высоко реактивными химическими веществами (концентрированные кислоты, щелочи, летучие вещества: эфир, хлороформ, уксусный ангидрид и т. д.) проводятся в вытяжном шкафу.
6. При ожогах концентрированными **щелочами** необходимо обработать пораженные места слабым раствором **уксусной кислоты** (щелочной ожог) и смыть большим количеством проточной воды.
7. При ожогах концентрированными **кислотами** необходимо обработать пораженные места раствором **питьевой соды** и смыть большим количеством проточной воды.
8. В лабораторной комнате запрещается:
 - работать при неисправной вентиляции;
 - производить какие-либо работы, не связанные с выполнением лабораторных занятий;
 - курить, принимать пищу, шуметь, громко разговаривать, производить резкие движения;
 - оставлять без присмотра работающие приборы, водяные бани, открытое пламя.
9. При работе со спиртовкой необходимо следить за равномерным нагреванием химической пробирки. При нагревании пробирки возможно бурное закипание и выброс содержимого пробирки на

- расстояние 2–3 м.
10. При растворении сильных кислот, особенно серной и азотной, следует приливать кислоту в воду.
 11. При работе с центрифугами применяют предварительно уравновешенные пробирки. Вынимать пробирки можно только после полной остановки ротора. Не допускается тормозить центрифугу руками, штативами и т. д.
 12. Все флаконы с реактивами должны иметь четкие надписи.
 13. При возникновении вопросов по технике безопасности необходимо проконсультироваться у преподавателя или лаборанта.

Химическая посуда: использование, мытье и хранение

В ходе практических работ студенты работают с химической посудой общего (пипетки, пробирки, мерные цилиндры, мерные колбы и др.) и специального назначения. Знакомятся с правилами мытья, сушки и хранения лабораторной посуды (даны в отдельном руководстве по технике лабораторных работ).

Основные приборы, используемые в практикуме

При проведении качественных и количественных биохимических исследований широкое применение нашли фотометрические и спектрофотометрические, реже турбидиметрические или нефелометрические методы анализа.

Методы основаны на регистрации различных параметров светового потока с определенной длиной волны, проходящего через исследуемый раствор: **рассеивание, пропускание и поглощение**.

Абсорбционная спектрофотометрия основана на определении коэффициента поглощения (D) или экстинкции (E) света определенной длины волны веществом.

Экстинкция прямо пропорциональна концентрации исследуемого вещества, молярному коэффициенту экстинкции и толщине слоя раствора (Закон Ламберта–Бугера–Бэра).

Экстинкция величина положительная и меняется от 0,000 до бесконечности, но современные приборы обычно измеряют ее до величин не более 2,000–3,000. Оптимальные результаты измерения находятся в пределах от 0,100 до 0,400 единиц оптической плотности (экстинкции).

Приборы позволяют измерять также коэффициент пропускания (T), величина которого выражают в процентах ($\%T$). То есть, коэффициент T – это процентная доля прошедшего через изучаемый раствор исходного светового потока, интенсивность которого принимают за 100%. Например, если $\%T=25$, то это значит, что через изучаемый раствор прошло 25% исходного светового потока, а 75%

– поглотилось этим раствором. Величины T и E (D) связаны так, что при 100% пропускании ($\%T=100$) поглощение света образцом (E или D) равно 0,000.

Абсорбционная спектроскопия в ультрафиолетовой (УФ) и видимой областях спектра служит для:

- высокочувствительного качественного анализа сложных смесей веществ;
- высокочувствительного количественного анализа;
- изучения структуры веществ, а также для оценки её изменений в различных условиях.

Достоинства метода

- Изучаемые вещества не разрушаются.
- Высокая чувствительность методов.
- Высокая специфичность методов.
- Возможность обнаружения низких концентраций веществ в составе сложных смесей без их предварительного разделения.

Аппаратура для абсорбционной спектроскопии

Основной принцип работы колориметров и спектрофотометров одинаков. Правила работы на приборах изложены в инструкциях к ним.

1. Фотоколориметр (фотометр, колориметр)

Имеет один источник света (лампа накаливания)

Спектральный диапазон, обычно составляет от 315 до 700 нм. В приборах старого образца диапазон задается светофильтрами, в современных приборах – дифракционной решеткой, которая является монохроматором.

Светофильтр выделяет полихромный световой поток. Для измерений используют кюветы из оптического стекла или специальной пластмассы.

2. Спектрофотометр

Для обеспечения работы в УФ и видимой областях спектра прибор оснащен отдельными источниками света.

Спектральный диапазон охватывает длины волн от 200–400 нм (УФ) и до 1000 нм (область видимого света). Длина волны (λ) задается монохроматором. Монохроматор создает монохромный световой поток.

Для измерений в УФ диапазоне спектра используются кюветы из кварцевого стекла.

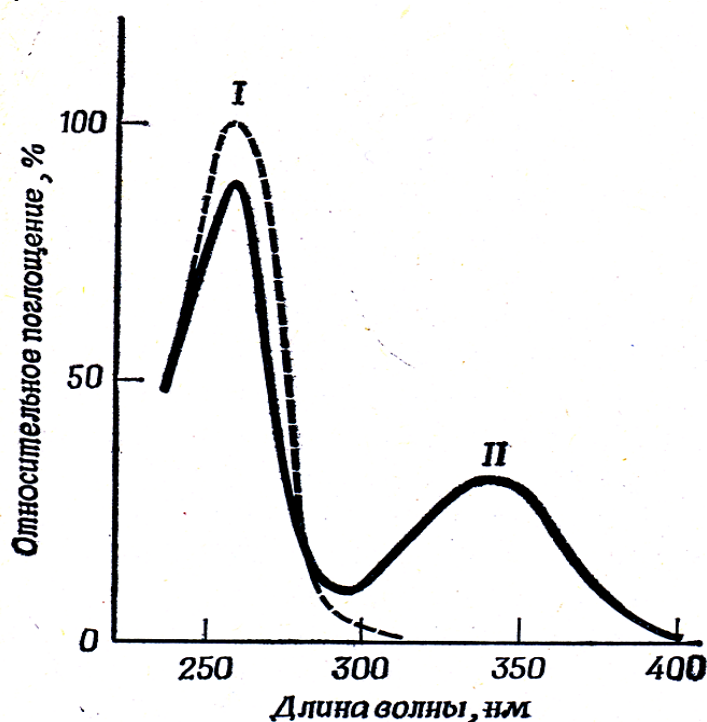
Область применения абсорбционной спектроскопии:

1. Измерение концентрации вещества в растворе (количественный анализ).
2. Регистрация течения химических превращений (кинетика хими-

ческих реакций).

- Идентификация веществ в растворе (спектр поглощения – «молекулярный паспорт» вещества – качественный анализ).
- Регистрация изменений физико-химических свойств биополимеров (денатурация-ренатурация ДНК).

Спектр поглощения (или абсолютный спектр поглощения) – зависимость количества поглощенного света от длины волны. У каждого вещества спектр поглощения уникален – это его «молекулярный паспорт».



Спектр поглощения окисленной (I) и восстановленной (II) форм пиридиновых нуклеотидов (НАД и НАДФ)

Примечание: поглощение при длине волны 260 нм обусловлено адениновым кольцом. Для восстановленной формы характерно снижение поглощения при длине волны 260 нм и появление интенсивного поглощения при 340 нм. Окисленная форма поглощает только при длине волны 260 нм.

Определять концентрацию веществ в растворе можно **турбидиметрическим** или **нефелометрическим** методами, измеряя интенсивность прошедшего или рассеянного световых потоков, соответственно. Например, для количественного определения концентрации иммунных комплексов, глобулиновых фракций белков и др.

Теория светорассеивания разработана физиком **Рэлеем**, который установил зависимость между интенсивностью рассеиваемого света (I_p) и длиной волны светового потока (λ), проходящего через водную суспензию (через образец, рассеивающий свет):

$$I_p = \frac{1}{\lambda^4}$$

1. Турбидиметрия (от англ. «turbidity» – мутность)

Метод основан на измерении **интенсивности прошедшего** через образец (не рассеянного) светового потока. Реализуется с помощью обычного лабораторного фотометра. Выбирают светофильтр, обеспечивающий световой поток с минимальной длиной волны. Метод эффективен, если образец рассеивает не менее 10% от величины падающего на образец светового потока (I_0).

2. Нефелометрия

Метод основан на измерении интенсивности **рассеянного образцом светового потока**. Метод более чувствителен, чем турбидиметрия и реализуется с помощью специального прибора – **нефелометра**. Через образец пропускают свет с длиной волны 600–700 нм (чем больше длина волны, тем шире диапазон размеров частиц, суспендированных в растворителе, которые рассеивают свет).

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Построение графика зависимости оптической плотности окрашенного раствора от длины волны на фотоэлектроколориметре

Принцип

Раствор определенного цвета избирательно поглощает световые волны соответствующей длины. Величина светового потока, прошедшая через раствор и попавшая на фотоэлемент, будет изменяться в зависимости от устанавливаемого светофильтра (длины волны), цвета раствора и толщины кюветы.

Реактивы

Растворы красителей различного цвета.

Проведение анализа

Исследуемый раствор наливают в кювету фотоэлектроколориметра и последовательно измеряют его оптическую плотность при различных длинах волн: от 415 нм до 630 нм против слепой пробы (дистиллированная вода). При каждой смене длины волны необходимо выставлять 0,0 единиц экстинкции (оптической плотности) по слепой пробе.

По полученным данным строится график. По горизонтальной оси (ось абсцисс) откладываются длины волн (нм), по вертикальной оси (ось ординат) – соответствующие значения оптической плотности (экстинкции) раствора. Отмечается участок кривой, где оптическая плотность имеет максимальное значение. Если это условие выполняется для нескольких длин волн, выбирается та, где чув-

ствительность колориметра выше. Результаты необходимо оформить в виде таблицы.

Образец таблицы для оформления результатов

Длина волны, нм	Экстинкция раствора красителя			
	Синий	Зеленый	Желтый	Розовый
415				
500				
530				
600				
630				

Особого внимания **требует выбор материала кювет** для измерения:

- стеклянные или пластиковые кюветы используют для работы в видимой области спектра, кварцевые – для измерения в ультрафиолетовом диапазоне;
- толщину кюветы может лимитировать объем измеряемого раствора или интенсивность окраски;
- уровень раствора в кювете, независимо от её толщины, должен быть таким, чтобы световой поток от источника света **полностью проходил через раствор**. Прохождение даже небольшой части светового потока **над уровнем раствора** в кювете **недопустимо**;
- кюветы должны быть чистыми, не иметь царапин на стенках;
- раствор должен быть гомогенным, прозрачным, без пузырьков воздуха;
- промывать кюветы следует дистиллированной водой или растворителем, сушить на воздухе.

Практическое значение

Навыки, полученные в результате выполнения этой работы, будут необходимы в дальнейшем для корректного выбора оптимальной длины волны при исследованиях различных окрашенных растворов.

РАЗДЕЛ 2

АМИНОКИСЛОТЫ, ПЕПТИДЫ, БЕЛКИ. СТРУКТУРА, СВОЙСТВА И ФУНКЦИИ

ТЕМА 2.1. АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ БЕЛКОВ

Актуальность

Белки – высокомолекулярные, азотсодержащие вещества, состоящие из аминокислот, имеющие вторичную, третичную и четвертичную структуру. Структура и функции белков определяются, прежде всего, их аминокислотным составом. Знание структуры и свойств аминокислот актуально для понимания первичной аминокислотной последовательности, пространственной организации белковой молекулы и теоретического предсказания конформации пептидов и белков. Широко применяемыми методами разделения, очистки белков, определения молекулярной массы, идентификации пептидов и белков (как и других веществ) являются различные методы хроматографии и электрофорез. Освоение этих методов актуально для расширения знаний в области биохимии белка и может иметь практическое значение в дальнейшей научной деятельности выпускника МБФ, так как любые манипуляции с биологическим материалом будут основаны на свойствах белковых структур.

Цель

Знакомство с классификацией аминокислот по химической структуре, физико-химическим свойствам, биологической ценности. Изучение качественных реакций на аминокислоты и белки. Освоение метода распределительной хроматографии и определение состава анализируемой смеси аминокислот.

Необходимо знать:

1. Классификацию аминокислот по химической структуре, физико-химическим свойствам и биологической ценности. Структурные формулы всех аминокислот.
2. Классификацию белков по функциям и химической структуре.
3. Механизм биуретовой, нингидриновой реакций и других универсальных и специфических реакций на аминокислоты и белки
4. Методы определения структуры и молекулярной массы белков. Принцип и типы хроматографии.

Необходимо уметь:

1. Проводить качественные реакции на аминокислоты.
2. Написать формулу тетрапептида с изоэлектрической точкой в щелочной (кислой, нейтральной) среде.
3. Подобрать условия для проведения электрофореза смеси белков с известной изоэлектрической точкой.
4. Написать три ионные формулы любой аминокислоты.
5. Проводить качественные реакции на белки.
6. Определять состав исследуемой смеси по результатам анализа на аминокислоты и белки.

Вопросы для самоподготовки:

1. Классификация аминокислот по структуре, физико-химическим свойствам, биологической ценности. Структурные формулы всех основных аминокислот:
2. Химические реакции аминокислот. Пути возникновения заменимых аминокислот в организме.
3. Физико-химические свойства аминокислот: полярность и растворимость, амфотерность, оптическая активность.
4. Белки, строение, биологическая роль и функции. Первичная, вторичная, третичная и четвертичная структуры белков. Связи, стабилизирующие пространственные структуры белков.
5. Реакции обнаружения аминокислот и белков.
6. Методы определения первичной последовательности белка, определения С- и N-концевых аминокислот.
7. Пептидная связь, ее характеристика и особенности.
8. Влияние рН среды на ионизацию аминокислот и белков.
9. Виды хроматографии (ионообменная, аффинная, адсорбционная, распределительная, гель-фильтрация), их характеристика.

Задание: Составить таблицу «Классификация аминокислот по строению радикалов, полярности, заряду, биологическому значению».

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 1

Качественные реакции на аминокислоты и белки

Реактивы

- 1) 1% раствор альбумина,
- 2) 1% раствор желатины,
- 3) сыворотка крови или яичный белок,
- 4) 0,5% раствор нингидрина,
- 5) концентрированная HNO_3 ,
- 6) 30% раствор NaOH ,
- 7) 10% раствор NaOH ,

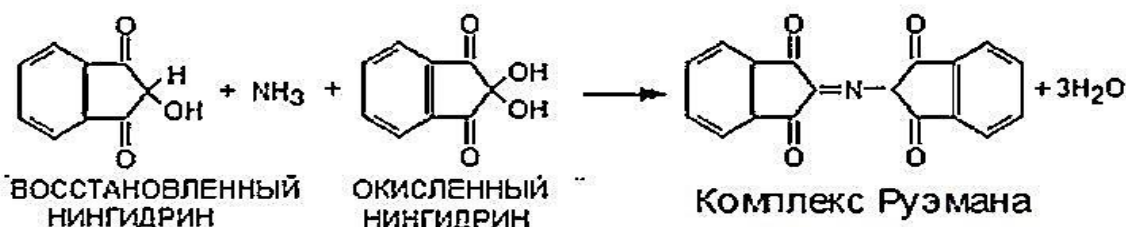
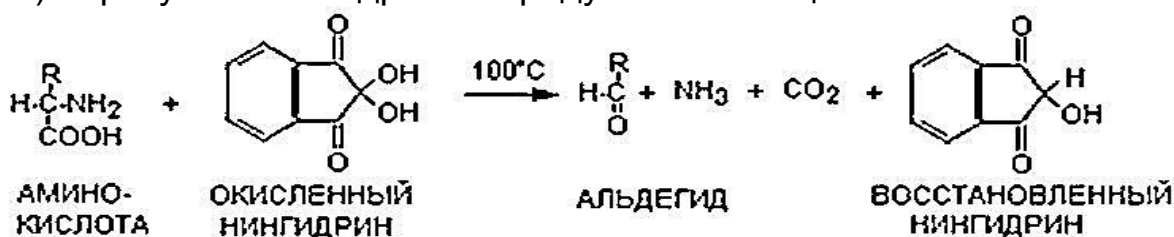
- 8) реактив Фоля (5% раствор $Pb(CH_3COO)_2$ в 10% NaOH),
- 9) 0,1% спиртовый раствор α -нафтола,
- 10) 2% раствор гипобромита натрия,
- 11) 1% раствор $CuSO_4$,
- 12) растворы аминокислот.

Нингидриновая реакция

Это универсальная реакция для обнаружения любых α -аминокислот.

Принцип

При нагревании раствора аминокислот в присутствии нингидрина происходит окислительное дезаминирование аминокислот и пептидов до альдегидов, NH_3 и CO_2 . Нингидрин восстанавливается и реагирует со следующей молекулой окисленного нингидрина и аммиаком, образуя окрашенный синий или синефиолетовый комплекс Руэмана. Иминокислоты (пролин и оксипролин) образуют с нингидрином продукт желтого цвета.



Проведение анализа

1,0 мл исследуемого раствора смешивают с 0,5 мл 0,5% раствора нингидрина.

Пробирки нагревают над спиртовкой под тягой в течение 3-5 мин до появления окраски.

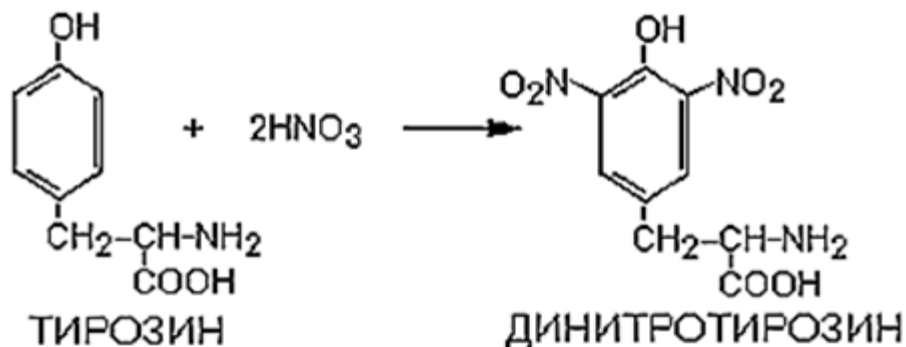
Ксантопротеиновая реакция

Эта реакция позволяет обнаружить присутствие ароматических аминокислот в растворе.

Принцип метода

Метод основан на способности ароматического кольца при взаимодействии с концентрированной азотной кислотой образовывать

динитропроизводное соединение желтого цвета, в щелочной среде образуются соли хиноидной структуры оранжевого цвета.



Проведение анализа

В пробирку вносят 0,5 мл исследуемого раствора, добавляют 3 капли концентрированной азотной кислоты и нагревают до кипения (**осторожно!**).

Наблюдают за появлением окрашивания. После охлаждения в пробирку добавляют по 1,0 мл 30% NaOH.

В пробирке с раствором желатины окраска не разовьется, так как этот белок практически не содержит ароматических аминокислот.

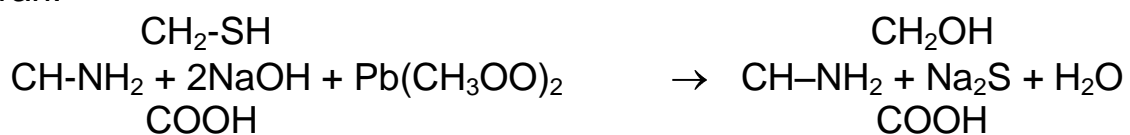
Реакция Фоля

Это реакция на аминокислоты, содержащие слабосвязанную серу (цистин, цистеин).

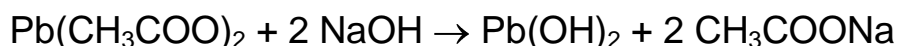
Принцип метода

Метод основан на способности тиогруппы цистеина или цистина в щелочной среде при нагревании образовывать сульфид натрия, который с плюмбитом натрия дает черный осадок сульфида свинца. Реакция идет в четыре этапа:

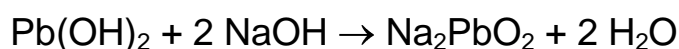
1 этап:



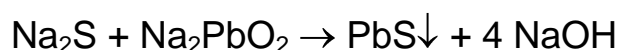
2 этап:



3 этап:



4 этап:



Проведение анализа

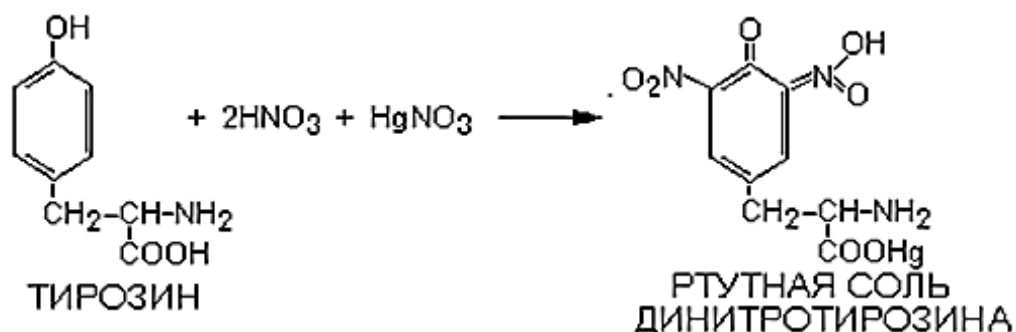
К 0,5 мл исследуемой жидкости прибавляют 1,0 мл реактива Фоля. Нагревают до кипения, наблюдают появление темного осадка.

Реакция Миллона

Эта реакция позволяет выявить наличие тирозина, свободного или входящего в состав белка.

Принцип метода

Метод основан на способности ароматического кольца при взаимодействии с концентрированной азотной кислотой в присутствии нитрата ртути образовывать нитропроизводное красно-коричневого цвета.



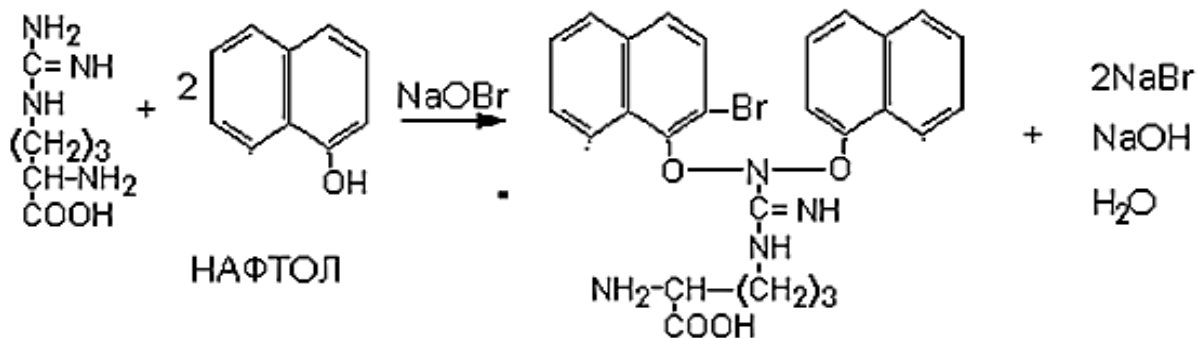
Проведение анализа

К 1,0 мл исследуемой жидкости прибавляют 1,0 мл реактива Миллона и осторожно нагревают.

Реакция Сакагучи

Принцип метода

Гуанидиновая группировка аргинина окисляется гипобромитом и аминокислота конденсируется с α -нафтолом с образованием соединения красного цвета.



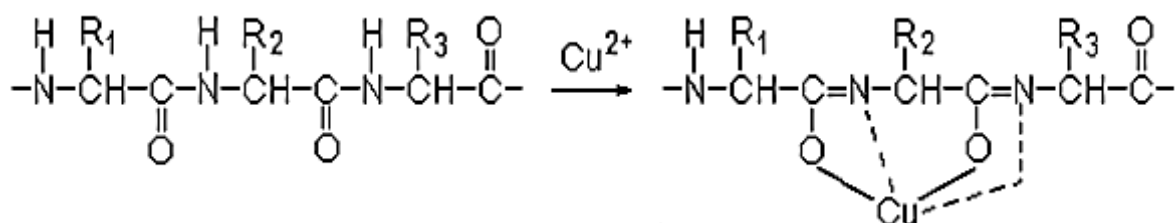
Проведение анализа

В пробирку вносят 1,0 мл исследуемого раствора, добавляют 1,0 мл NaOH, 1,0 мл спиртового раствора α -нафтола и по каплям (1–5 капель) раствора гипобромита натрия.

Биуретовая реакция

Принцип реакции

Метод основан на способности пептидной связи белков в щелочной среде к таутомерной перегруппировке (переход кетоформы в енольную форму), OH-группа при этом диссоциирует и кислород взаимодействует с ионами Cu^{2+} . Кроме того, ионы меди образуют координационные связи с атомом азота. Возникает стабильный комплекс фиолетового цвета с красным или синим оттенком в зависимости от числа пептидных связей в белке. Биуретовую реакцию дают вещества, содержащие не менее двух пептидных групп.



Проведение анализа

В пробирку вносят 0,5 мл исследуемого раствора. Добавляют 1,0 мл 10% NaOH и 2 капли 1% CuSO_4 .

Задание

Дано 4 флакона с исследуемой жидкостью. Прделав качественные реакции на аминокислоты и белок, определить, что содержится в каждом флаконе: яичный белок, желатина, раствор тирозина либо цистеина.

Оформление работы

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

Образец таблицы для оформления результатов

№ пробы	Реакции						Что содержится
	Нингидриновая	Ксантопротеиновая	Фоля	Миллона	Сакагучи	Биуретовая	
1							
2							
3							
4							

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 2
Разделение смеси аминокислот
методом распределительной радиальной хроматографии

Задача, с которой биохимикам постоянно приходится сталкиваться при исследовании биологических соединений – это их выделение и очистка. Одним из наиболее удобных методов разделения является хроматографический метод. Все хроматографические системы состоят, как правило, из двух фаз. Одной из них является *неподвижная фаза*, которая бывает твердой, жидкой или представляет собой смесь твердой и жидкой фаз. Вторая, *подвижная фаза*, может быть жидкой или газообразной; она обычно течет по неподвижной фазе или пропускается через нее. Основопологающим в хроматографии является понятие R_f (коэффициент распределения вещества), под которым понимают отношение концентрации вещества в подвижной фазе к его концентрации в неподвижной фазе.

В зависимости от **механизма разделения** веществ разделяют несколько видов хроматографии: адсорбционную, аффинную, ионообменную, диффузионную (гель-фильтрацию), распределительную.

По **технике** хроматография может быть колоночной или плоскостной (на бумаге или в тонком слое).

По **агрегатному состоянию** фаз различают газовую, жидкостную или газожидкостную хроматографию.

По **направлению движения** растворителя – восходящую, нисходящую, радиальную, одномерную или двумерную.

Разделение может происходить за счет установления:

- адсорбционного равновесия между неподвижной твердой и подвижной жидкой фазами (**адсорбционная хроматография**);
- равновесного распределения между неподвижной жидкой (или полужидкой) и подвижной жидкой фазами (**противоточное распределение и хроматография на бумаге, распределительная хроматография**);
- ионообменного равновесия между ионообменной смолой (неподвижная фаза) и электролитом (подвижная фаза) (**ионообменная хроматография**);
- равновесия между жидкой фазой на внутренней и внешней поверхностях пористой структуры или «молекулярного сита» (**проникающая хроматография или гель-фильтрация**);
- равновесного связывания макромолекулы с малой молекулой, по отношению к которой она проявляет высокую биологическую специфичность, и, следовательно, сродство (**аффинная хроматография**).

Реактивы

- 1) растворы аминокислот-свидетелей – глутамат (60 мг/10 мл); аланин (40 мг/10 мл); лейцин (50 мг/10 мл),
- 2) хроматографическая смесь (бутанол:уксусная кислота:вода в объемном соотношении 1,5:1,5:1,0),
- 3) 0,2% спиртовый раствор нингидрина,
- 4) смесь растворов аминокислот.

Оборудование

Термостат +37 °С, сушильный шкаф 100 °С, пульверизатор, чашки Петри, хроматографическая бумага.

Принцип метода

Метод распределительной хроматографии аминокислот на бумаге основан на различной растворимости аминокислот в двух частично несмешивающихся между собой жидкостях (например, вода:бутиловый спирт). Вода смачивает целлюлозные волокна и образует неподвижную водную фазу. Бутанол движется по бумажному диску, увлекая за собой аминокислоты, соответственно их коэффициенту распределения между водой и спиртом. Скорость перемещения отдельных аминокислот зависит от размеров, формы, полярности молекулы, способности растворяться в различных растворителях (чем более полярная аминокислота, тем меньше ее растворимость в неполярных растворителях), от избирательной адсорбции на бумаге, типа бумаги, других условий опыта.

Проведение анализа

1. Специальную хроматографическую бумагу разделить на 4 сектора согласно исходным растворам. В центре хроматограммы вставить фитиль из скрученной полоски бумаги. На расстоянии 1,0 см от центра карандашом отметить линию старта, на которую стеклянными капиллярами нанести раствор аминокислот-свидетелей и исследуемую смесь аминокислот.
2. Хроматограмму помещают в заранее приготовленную хроматографическую камеру (чашку Петри) на 1/3 заполненную хроматографической смесью. Разделение проводят в термостате, при +37 °С под визуальным контролем (примерно в течение 30 мин). По достижении линией фронта растворителя границ бумажного диска разделение прекращают.
3. Хроматограмму высушивают в сушильном шкафу (100 °С), предварительно пометив по всей окружности линию фронта растворителя. Хроматограмму опрыскивают раствором нингидрина и на несколько минут помещают в сушильный шкаф при 100 °С.

4. Рассчитывают коэффициент распределения R_f для каждой аминокислоты:

$$R_f = a/b,$$

где: **a** – расстояние, пройденное от линии старта аминокислотой (в мм), **b** – расстояние, пройденное фронтом растворителя (в мм).



Оформление работы

Отмечают принцип метода, зарисовывают вид хроматограммы, рассчитывают величину коэффициента R_f для каждого пятна и идентифицируют аминокислоты, находящиеся в исследуемом растворе. Обсуждают возможные способы количественного определения содержания отдельных аминокислот в растворе.

ТЕМА 2.2. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ. МЕТОДЫ БЕЛКОВОЙ ХИМИИ

Актуальность

Способность белков подвергаться денатурации и высаливанию используется для определения концентрации белка, определения содержания белковых фракций, получения безбелковых растворов, применения белковых растворов в качестве противоядия при отравлении солями тяжелых металлов. Реакции осаждения белков лежат в основе выделения и очистки ферментов, гормонов, получения белковых препаратов (лечебные сыворотки, кристаллические белки).

Цель

Знакомство с физико-химическими свойствами белков, методами осаждения, денатурации и очистки белков от низкомолекулярных примесей, изучение механизма денатурации и высаливания под действием различных агентов.

Необходимо знать:

1. Структура белковых молекул. Связи, стабилизирующие эти структуры.
2. Факторы, стабилизирующие молекулу белка в растворе.
3. Механизм денатурации белка под действием высоких температур, минеральных и органических кислот, солей тяжелых металлов, органических растворителей.
4. Влияние на коагуляцию белка pH среды.
5. Методы определения формы белковой молекулы, молекулярной массы белка.
6. Принцип метода колоночной гель-хроматографии, типы сефадексов.
7. Методы разделения белка от низкомолекулярных примесей, фракций белков сыворотки крови.

Необходимо уметь:

1. Проводить денатурацию белка различными способами и получать безбелковый раствор.
2. Выделять белки из растворов.
3. Фракционировать белки сыворотки крови.
4. Подготовить сефадекс и колонку к работе.
5. Проводить очистку белкового раствора от низкомолекулярных примесей.
6. Определять наличие белка в элюируемой фракции.
7. Рассчитать коэффициент распределения вещества.

Вопросы для самоподготовки:

1. Что такое денатурация? Факторы, вызывающие денатурацию. Свойства денатурированных белков. Осаждение белка из раствора.
2. С помощью каких методов можно освободить раствор белка от низкомолекулярных примесей?
3. Марки сефадекса.
4. На чем основан принцип обессоливания белков с использованием сефадекса G-25?
5. Какова характеристика декстрана голубого?
6. В чем заключается отличие метода диализа от обессоливания путем фильтрации через сефадекс? Преимущества.
7. Какие существуют качественные реакции на SO_4^{2-} , Cl^- ?
8. Как проверить чистоту выделенного препарата биополимера?
9. Каков принцип электрофоретического разделения белков в ПААГ?
10. Что такое седиментационный анализ? Возможности этого метода.
11. Какими методами можно отделить альбумины сыворотки крови

- от глобулинов?
12. Что такое скоростное центрифугирование? Преимущества и недостатки этого метода.
 13. Что такое хроматография? Виды ее и принцип разделения?
 14. Принцип аффинной хроматографии. Возможности этого метода.
 15. Каков принцип метода гель-фильтрации?
 16. Что такое дифференциальное центрифугирование? Как проводится контроль чистоты фракций?
 17. Как можно определить форму белковой молекулы?
 18. Какие фракции получатся при электрофоретическом разделении белков сыворотки крови на бумажном носителе?
 19. Что такое центрифугирование в градиенте плотности?
 20. Для чего применяется этот метод?
 21. Что такое изоэлектрическое фокусирование?
 22. Какие фракции можно получить при электрофорезе белков сыворотки в ПААГ?
 23. Какими методами можно определить молекулярную массу?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 1 **Очистка белка от низкомолекулярных примесей гель-хроматографии**

Гель-хроматография (гель-фильтрация или проникающая хроматография) – фракционирование (разделение) смеси компонентов по размерам молекул путем прохождения их через гели с определенной величиной пор. Одним из материалов, используемых для этой цели, являются различные виды сефадексов. Сефадексы - продукты взаимодействия полисахарида декстрана с эпихлоргидрином. В этих полимерах молекулы декстрана соединены поперечными связями с эпихлоргидрином, образуя глобулярные сетчатые структуры с внутренним пространством. Ячейки этой сетки или поры имеют различные размеры, в зависимости от вида сефадекса. Технология изготовления сефадексов была разработана и запатентована шведской фирмой «Pharmacia Fine Chemicals». Название торговой марки «**sephadex**» происходит из слов: **SE** – separation (разделение) + **PHA** – «Pharmacia Fine Chemicals» + **DEX** – декстран.

В настоящее время выпускают 8 видов сефадексов.

Гранулы сефадексов имеют трехмерную структуру, обладают высокой гидрофильностью благодаря наличию большого числа гидроксильных групп, но не растворяются в воде. В воде и водных растворах солей сефадексы способны набухать – формировать гидратные оболочки вокруг декстрановых нитей, образуя гели. Гели сефадексов представляют собой своеобразные «молекулярные си-

та». Скорость прохождения смеси молекул через «сито» определяется размерами молекул.

Обессоливание белков можно рассматривать как частный случай использования сефадексов. По сравнению с методом диализа процесс обессоливания на сефадексе осуществляется гораздо быстрее.

Типы сефадексов и их основные характеристики

Тип сефадекса	Диапазон фракционирования, молекулярная масса	Отношение объема набухшего геля к сухой массе, мл/г
G-10	до 700	2–3
G-15	до 1500	2,5–3,5
G-25	1–5 тыс.	4–6
G-50	1,5–30 тыс.	9–11
G-75	3–80 тыс.	12–15
G-100	4–150 тыс.	15–20
G-150	5–300 тыс.	20–30
G-200	5–600 тыс.	30–40

Задачи работы

1. Разделение смеси декстрана голубого и бихромата калия.
2. Обессоливание белков сыворотки крови.
3. Определение внешнего объема колонки.
4. Расчет общего объема (V_0), элюционного объема (V_e) и внутреннего объема (V_i) колонки.
5. Обессоливание белкового раствора.

Реактивы

- 1) 0,1% водный раствор декстрана голубого, молекулярная масса 2×10^6 Да,
- 2) 5% раствор бихромата калия,
- 3) 1% раствор яичного альбумина или сыворотка крови,
- 4) биуретовый реактив,
- 5) гель сефадекса G-25.

Оборудование

- 1) хроматографическая колонка с краном,
- 2) химические стаканы,
- 3) штатив с пробирками,
- 4) пипетки.

**Определение общего, внешнего и внутреннего
объемов хроматографической колонки.
Очистка белка от примеси неорганической соли методом
гель-хроматографии**

***Принцип разделения смеси
молекул при гель-хроматографии***

Крупные молекулы смеси не проникают внутрь гранул геля, поскольку их размеры больше диаметра пор гелевой сетки. По этой причине крупные молекулы передвигаются вдоль колонки по пространству между гранулами геля. При этом скорость движения этих молекул практически равна скорости движения элюента. Мелкие молекулы проникают во внутреннее пространство гранул геля, поскольку их размер меньше диаметра пор гелевой сетки. Оказавшись внутри гранулы геля, мелкие молекулы удерживаются там на короткое время и вымываются наружу током элюента. Эти явления многократно повторяются. Время удержания мелких молекул суммируется, за счет чего эти молекулы движутся вдоль колонки медленнее, чем крупные молекулы. В результате, крупные молекулы, двигаясь с большей скоростью, выходят из колонки (элюируются) первыми, а мелкие молекулы, двигаясь с меньшей скоростью, выходят из колонки последними.

Для корректного проведения метода гель-фильтрации необходимо уметь определять следующие параметры колонки: **V_o** – внешний объем (объем выхода), т. е. объем растворителя, заполняющего пространство между гранулами геля, мл; **V_e** – объем выхода или элюионный объем, мл; **V_i** – внутренний объем, суммарный объем растворителя, находящегося внутри всех гранул геля, мл. Элюат, выходящий из колонки, собирают в индивидуальные пробирки порциями одинакового объема, например, по 3,0 мл.

Общий объем колонки (**V_o**) – объем геля, заполняющего стеклянную колонку. Его вычисляют по формуле:

$$V_o \text{ (см}^3 \text{ или мл)} = \pi \times r^2 \times h$$

где: π – 3,14;

r^2 – квадрат внутреннего радиуса круглой стеклянной колонки (см);

h – высота геля, находящегося в колонке (см).

Таким образом, вычислив V_o и вычтя из него V_e , который определяют эмпирически, получаем значение V_i :

$$V_i = V_o - V_e$$

Внешний объем колонки (**V_e**), заполненной любым из выпускаемых видов сефадексов, можно определить с помощью высокомо-

лекулярного вещества, не проникающего внутрь частиц геля, благодаря большому размеру его молекул. Для этих целей было синтезировано гидрофильное соединений – декстран голубой – искусственный высокомолекулярный полисахарид, окрашенный в голубой цвет. Определив объем выхода декстрана голубого можно вычислить внешний объем колонки (V_e).

Для определения внешнего объема колонки (объёма выхода) декстрана голубого, в собираемых порциях элюата необходимо определить концентрацию в них декстрана голубого, поскольку необходимо знать, в какой порции элюата будет содержаться его максимальная концентрация. Оперативно, относительную концентрацию декстрана голубого в собранных порциях элюата, можно определить фотометрически. Для этого определяют экстинкцию порций элюата, измеренных при длине волны 650 нм против дистиллированной воды.

Объем выхода V_e (мл) определяют, как сумму объемов порций элюата, собранных с момента нанесения декстрана голубого на колонку (всегда порция № 1) до той порции элюата (включительно), которая будет содержать максимальную концентрацию декстрана голубого.

Одно из практических значений определения величины V_e состоит в том, что с помощью гель-хроматографии можно сравнительно быстро и точно определять молекулярную массу белков. Существует четкая зависимость между величиной V_e и десятичным логарифмом (I_g) молекулярной массы белка. Сначала строят калибровочный график, на котором по оси абсцисс (X) отмечают I_g молекулярной массы двух разных белков с известными массами. Два белка необходимо для того, чтобы через две точки провести линию калибровочного графика. На оси ординат (Y) отмечают значения V_e для этих же белков, которые определяют эмпирически, поочередно пропуская калибровочные белки через одну и ту же колонку. Очевидно, что колонку следует заполнять тем видом сефадекса, внутрь гранул которого не будут проникать ни калибровочные белки, ни изучаемый белок. После получения калибровочного графика, через эту же колонку пропускают изучаемый белок и определяют V_e для него. По графику находят сначала I_g , а затем и истинную величину молекулярной массы изучаемого белка.

Определение элюционного объема для декстрана голубого или внешнего объема колонки (V_e)

Подготовка колонки

Хроматографическую колонку 15×2 см укрепляют строго вертикально на штативе. Помещают в основание колонки комочек из ка-

проновых ниток или поролоновый фильтр, заливают в колонку 2 мл дистиллированной воды и, осторожно постукивая стеклянной палочкой, удаляют пузырьки воздуха из фильтра. Колонку заполняют густой суспензией предварительно набухшего сефадекса почти доверху. Открывают кран у основания колонки, чтобы жидкость вытекала со скоростью 1 капля за 5–10 с до тех пор, пока слой сефадекса будет на 3–4 см ниже верхнего края стеклянной колонки. Необходимо избегать попадания в колонку пузырьков воздуха.

Нанесение раствора декстрана голубого

Сначала необходимо настроить стационарный поток дистиллированной воды через колонку. Например, вращая кран, установить вытекание одной капли воды с интервалом в 7–10 секунд.

На поверхность геля пипеткой наслаивают 1,0 мл 0,1 % раствора декстрана голубого. Объем вносимой пробы не должен превышать $\frac{1}{10}$ общего объема колонки или $\frac{1}{3}$ внешнего объема колонки. Сбор порций элюата объемом 1,0 мл начинают сразу после нанесения на гель всего объема раствора декстрана. Над поверхностью сефадекса следует поддерживать слой воды высотой не менее 1 см. Если колонка заполнена равномерно, то окрашенная в голубой цвет зона будет двигаться по колонке параллельно ее основанию. Необходимо дождаться, чтобы из колонки полностью вышел декстран голубой – голубые порции элюата станут бесцветными. Методика вычисления V_e для декстрана описана выше, она будет соответствовать внешнему объему данной колонки.

После проведения разделения гель промывают дистиллированной водой и оставляют в рабочем состоянии, перекрыв кран. Над поверхностью геля необходимо оставить слой воды высотой не менее 1 см.

Для оформления отчета рассчитывают величины V_e для декстрана голубого, а также значения V_0 и V_i для данной колонки.

Очистка белкового раствора

от примеси неорганической соли с помощью сефадекса G-25

1,0 мл 1% раствора альбумина, приготовленного на 0,9% NaCl, наносят на подготовленную колонку, заполненную сефадексом G-25. Элюирование ведут с помощью дистиллированной воды, как описано выше. Фракции элюата собирают в индивидуальные пробирки порциями по 3,0 мл. Очевидно, что белок (альбумин) выйдет из колонки первым, соль – за белком. Элюирование ведут до тех пор, пока из колонки не выйдет вся соль.

Концентрацию белка в порциях собранного элюата можно определить спектрофотометрически – по поглощению ультрафиолетового излучения раствором белка, обусловленное присутствием

в его составе ароматических аминокислот, имеющих максимум поглощения при длине волны 280 нм. Экстинкцию измеряют при двух длинах волн: 280 и 260 нм против дистиллированной воды в кварцевых кюветах толщиной 1 см. Это необходимо для коррекции концентрации белка в случае присутствия в образце следов нуклеиновых кислот, поглощающих при длине волны 260 нм. Вычисление концентрации белка ведут по формуле:

$$\text{Концентрация белка, мг/мл} = 1,45 \times E_{280} - 0,74 \times E_{260},$$

где: E_{280} и E_{260} – экстинкции элюата, измеренные при соответствующих длинах волн; **1,45** и **0,74** – эмпирические коэффициенты.

Появление в порциях элюата соли (точнее, ионов хлора) обнаруживают реакцией с азотнокислым серебром: проба мутнеет в результате образования нерастворимого в воде хлорида серебра. Степень помутнения пропорциональна содержанию ионов хлора.

Оформление результатов работы

В тетрадах отмечают принцип освоенных методов. Результаты оформляют в виде таблицы.

Образец таблицы для оформления результатов

	№ порций собранного элюата								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Белок									
Nalco									

В порциях элюата с отсутствием белка ставят прочерки. Отсутствие помутнения в порциях элюата по результату реакции с азотнокислым серебром обозначают знаком «–», появление помутнения – знаком «+». Количеством знаков «+» (от «+» до «++++») следует отразить степень помутнения проб. Выхода соли из колонки проходит через максимум до исчезновения помутнения, что говорит о полном выходе соли из колонки.

Проверка чистоты обессоливания

Во фракциях, содержащих белок, не должно быть следов соли (ионов хлора). Если очистка белка проведена качественно, то реакция с азотнокислым серебром будет отрицательной – белок-содержащие пробы останутся абсолютно прозрачными.

Регенерация сефадекса

Гель сефадекса после использования можно хранить в плотно закупоренном флаконе в холодильнике. Предварительно в гель вносят бактериостатические вещества: 5% раствор формалина, 0,02% раствор азиды натрия (NaN_3), 0,1% раствор хлорэтана или

добавить в гель сефадекса 1–2 капли хлороформа или толуола.

При длительном перерыве в работе сефадекс следует высушить. Для этого, следует промыть колонку 1% раствором щелочи для полного удаления белка, который может задержаться на колонке. Затем гель промывается на воронке Бюхнера большим количеством воды, чтобы удалить остаток солей и щелочь. Сушка сефадекса ведется проводкой по спиртам с увеличением концентрации от 20% до 96% (30–40%, 50–60%, 70–80%) и несколько раз 96% этанолом. Каждый раз сефадекс должен быть в контакте со спиртом не менее 30 мин. Остатки спирта удаляют на воронке Бюхнера.

Диализ

Принцип

Диализ – один из способов очистки белка от низкомолекулярных примесей. Метод основан на неспособности молекул белка (или других коллоидных частиц) проникать через полупроницаемую мембрану из целлофана, коллодия и др. Низкомолекулярные примеси, в отличие от молекул белка, легко проходят через поры этих мембран. Метод диализа широко используется в биомедицинских исследованиях для разделения и очистки белков и других биополимеров от примесей солей и низкомолекулярных органических соединений. На этом же принципе основан метод гемодиализа, который применяется для лечения больных с почечной недостаточностью (аппарат «искусственная почка»).

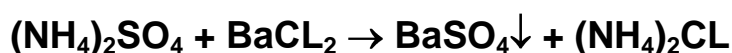
Реактивы

- 1) раствор яичного белка,
- 2) насыщенный раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,
- 3) раствор BaCl_2 .

Проведение анализа

К 5,0 мл раствора яичного белка добавляют 1 каплю насыщенного раствора сульфата аммония.

Из полученной смеси отбирают порцию и проводят реакцию с BaCl_2 на присутствие сульфатов. Сульфат бария нерастворим в воде – проба мутнеет:



Параллельно проводят ту же пробу с дистиллированной водой, убеждаясь в отсутствии в ней сульфатов.

Готовят диализный мешочек из предварительно прокипяченного в дистиллированной воде целлофана, наливают в него раствор белка с сульфатом аммония и помещают мешочек в диализную камеру

с дистиллированной водой. Через 1 час определяют наличие белка и сульфата аммония в содержимом мешочка (диализате) и в диализной (внешней) жидкости.

Оформление работы

В рабочих тетрадях отмечают принцип метода и результаты проведения анализа. Отчет составляется в виде таблицы.

Образец таблицы для оформления результатов

Определяемые компоненты	До диализа		После диализа	
	Внешняя жидкость	Внутренняя жидкость	Внешняя жидкость	Внутренняя жидкость
Сульфаты				
Белок				

Делается вывод о возможности очистки белка методом диализа.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 2

Определение изоэлектрической точки белка

Изоэлектрическая точка белка (ИЭТ, pI) – такое значение pH раствора, при котором суммарный электрический заряд белковой молекулы, равен нулю, то есть, когда на поверхности молекулы количество отрицательных зарядов равно количеству положительных зарядов. По этой причине белки, находясь в изоэлектрической точке, не перемещаются в электрическом поле. pI является характерной константой белков. pI большинства белков организма человека и животных лежит в пределах от 5,5 до 7,0, что свидетельствует о частичном преобладании кислых аминокислот.

Принцип

Метод определения pI основан на способности растворенного белка в изоэлектрической точке переходить в неустойчивое состояние и выпадать в осадок, что проявляется в помутнении раствора. При добавлении водоотнимающего средства (спирта, эфира, ацетона) процесс осаждения ускоряется.

Реактивы

- 1) раствор яичного белка,
- 2) 96° этанол,
- 3) 0,2М раствор CH_3COOH ,
- 4) 0,2М раствор CH_3COONa .

Проведение анализа

Смешивая в определенном соотношении 0,2М раствор CH_3COOH и 0,2М раствор CH_3COONa , готовят буферные растворы с разным значением рН в шести пробирках.

Затем во все пробирки добавляют раствор белка и органический растворитель (этанол).

Оформление работы

В рабочих тетрадях отмечают принцип метода, результаты проведения анализа: отмечают интенсивность помутнения в пробах и выделяют пробу с максимальным помутнением.

Образец таблицы для оформления результатов

№ пробы	CH_3COOH , мл	CH_3COONa , мл	рН смеси	Раствор белка, мл	Этанол, мл	ИЭТ белка
1	1,9	0,1	3,4	0,5	2,0	
2	1,8	0,2	3,8	0,5		
3	1,4	0,6	4,4	0,5	2,0	
4	1,0	1,0	4,7	0,5	2,0	
5	0,6	1,4	5,1	0,5	2,0	
6	0,2	1,8	5,7	0,5	2,0	

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 3

Денатурация белка

Денатурация – утрата нативной трехмерной конформации белковой молекулы (нарушение вторичной, третичной и четвертичной структур). Вместе с тем, при денатурации **аминокислотная последовательность** в молекуле белка, то есть, его **первичная структура, остается неизменной**. В результате денатурации белок теряет свою биологическую функцию, что часто сопровождается ухудшением его растворимости в водных системах. Поскольку первичная структура белка при денатурации сохраняется, удаление из раствора денатурирующих агентов приводит к восстановлению нативной структуры белка. Происходит **ренатурация** белка. Таким образом, процесс денатурации белков – обратимое явление. К числу денатурирующих агентов относятся такие органические растворители: спирт, эфир, хлороформ. Денатурацию можно вызвать также кратковременным (в течение нескольких минут) нагреванием раствора белка до температуры не выше +50 °С.

Денатурацию белка нельзя путать с **разрушением (деградацией)** молекулы белка. При разрушении молекулы белка нарушаются

не только его четвертичная, третичная и вторичная структуры, но и первичная структура – происходит **разрыв пептидных связей**. Это необратимое явление: белок с разрушенной первичной структурой не способен к ренатурации. Разрушение белка происходит под действием солей тяжелых металлов, минеральных и органических кислот, длительного нагревание раствора белка до температуры выше +50 °С (в том числе кипячения).

Необходимо обсудить свойства белков, как коллоидных систем, методы осаждения белков из растворов и факторы денатурации.

Реактивы

- 1) 1% раствор CH_3COOH ,
- 2) этиловый спирт,
- 3) 10% раствор CH_3COOH ,
- 4) хлороформ, 4) 10% раствор NaOH ,
- 5) ацетон,
- 6) насыщ. раствор NaCl ,
- 7) HCl конц.,
- 8) 10% раствор ТХУ,
- 9) конц. HNO_3 ,
- 10) 7% раствор CuSO_4 , 11) конц. H_2SO_4 ,
- 11) 5% раствор $\text{Pb}(\text{CHCOO})_2$,
- 12) насыщ. раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,
- 13) кристаллический $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Исследуемый материал

Сыворотка крови, раствор яичного белка, 1% раствор альбумина.

Тепловая денатурация

Денатурация белка под действием высоких температур связана с перестройкой структуры белковой молекулы, в результате которой белок теряет свои нативные свойства, уменьшается его растворимость. Присутствие солей и концентрация водородных ионов играют важную роль в выпадении в осадок денатурированного белка. Наиболее полное и быстрое осаждение происходит в изоэлектрической точке белка. В сильно кислых (за исключением азотной, трихлоруксусной и сульфосалициловой кислот) и сильно щелочных растворах денатурированный белок не выпадает в осадок, так как частицы белка получают дополнительный положительный (кислая среда), либо отрицательный (щелочная среда) заряд, что повышает их устойчивость в растворе. Однако в сильно кислых растворах белки при нагревании могут коагулировать при добавлении достаточно-

го количества нейтральной соли, так как адсорбированные ионы соли нейтрализуют заряд частиц белка.

Проведение анализа

В пять пронумерованных пробирок наливают по 0,5 мл раствора яичного белка. Первая проба остается для исследования денатурации в нейтральной среде. В остальные пробы добавляют:

- во 2 пробу – 1 каплю 1% раствора CH_3COOH (слабокислая среда);
 - в 3 пробу – 1 каплю 10% раствора CH_3COOH (сильнокислая среда);
 - в 4 пробу – 1 каплю 10% раствора CH_3COOH и 1 каплю насыщенного р-ра NaCl (сильнокислая среда + электролит);
 - в 5 пробу – 1 каплю 10% раствора NaOH (щелочная среда).
- Все пробы помещают в кипящую водяную баню не более, чем на 2 мин.

Оформление работы

Отмечают принцип метода, результаты проведения анализа. В выводах объясняют наличие или отсутствие осадка денатурированного белка (изоэлектрическая точка яичного белка находится в слабокислой среде).

Денатурация белка минеральными и органическими кислотами

Концентрированные кислоты вызывают денатурацию белка в результате нейтрализации заряда и дегидратации белковой молекулы, что ведет к нарушению пространственной организации белковой молекулы.

Проведение анализа

В четыре пронумерованных пробирки наливают по 1,0 мл соляной, серной, азотной и трихлоруксусной кислот.

Затем осторожно настилаивают равный объем раствора яичного белка.

Осторожно встряхивая пробирки, обнаруживают растворение осадка белка в случае осаждения соляной и серной кислотами. В пробирке с азотной и трихлоруксусной кислотами осадок не растворяется.

Оформление работы

Отмечают принцип методов, результаты проведения анализа. В выводах указывают механизм осаждения белка данными кислотами.

Денатурация белка солями тяжелых металлов

Соли тяжелых металлов необратимо связываются с функциональными группами боковых радикалов аминокислот белка, вызывая снятие заряда, нарушение пространственной структуры и образование нерастворимых комплексов. Избыток солей тяжелых металлов приводит к растворению осадка из-за адсорбции иона металла и приобретении вследствие этого белковой молекулой положительного заряда.

Проведение анализа

В две пробирки вносят по 1,0 мл раствора яичного белка.

В первую пробирку добавляют 1 каплю 5% раствора уксуснокислого свинца, во вторую – 1 каплю 7% раствора сульфата меди.

Наблюдают появление осадка.

Затем создают избыток соли, добавляя еще по 10 капель раствора уксуснокислого свинца и сульфата меди.

Оформление работы

Отмечают принцип методов, результаты проведения анализа. Делают заключение по результатам эксперимента.

Денатурация органическими растворителями

Органические растворители дегидратируют молекулы белка, нарушая гидрофобные взаимодействия внутри молекулы белка, снижая его устойчивость в растворе.

Проведение анализа

В пробирку вносят 1 мл 1% раствора яичного белка и 1 мл этилового спирта, ацетона или хлороформа, раствор мутнеет. При добавлении избытка воды происходит растворение осадка.

Оформление работы

Отмечают принцип методов, результаты проведения анализа. В выводах объясняют результаты эксперимента.

Денатурация белка алкалоидами

Денатурация белка алкалоидами обусловлена наличием в белке гетероциклических группировок, аналогичных тем, что имеются в молекулах алкалоидов (пиррольных, индольных, имидазольных и др.). Алкалоиды применяются, в частности, при лечении ожогов, денатурируя белок на поверхности ожога и препятствуя обезвоживанию тканей и проникновению инфекции.

Проведение анализа

В пробирки вносят по 0,5 мл яичного белка и 1 капле 1% уксусной кислоты.

Добавляют по 2–3 капли 10% раствора пикриновой кислоты или насыщенного раствора танина.

Оформление работы

Отмечают принцип методов, результаты проведения анализа. Делают заключение по результатам эксперимента.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 4 **Методы высаливания белков**

Высаливание – обратимое осаждение белка из раствора нейтральными солями (NH_4Cl , NaCl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и др.) и солями щелочных и щелочно-земельных металлов (Na_2SO_4 , NaCl , KCl , MgSO_4 , MgCl_2 и др.). Катионы и анионы использованных солей вытесняют диполи воды с поверхности несущих электрический заряд функциональных групп белка. В результате этого происходит локальное удаление гидратных оболочек и нейтрализация электрических зарядов, исчезает взаимоотталкивание молекул, что приводит к их «слипанию» и существенному ухудшению их растворимости - белок осаждается из раствора. При этом у осаждённого белка частично изменяется нативная конформация, но сохраняется первичная структура. Это обратимое явление: при удалении солей белок восстанавливает нативную конформацию и биологические свойства. Степень осаждения белка зависит от ионной силы раствора, размера белковой молекулы (молекулярной массы), величины ее электрического заряда и гидрофильности.

Метод высаливания может быть использован в лабораториях для раздельного осаждения альбуминов и глобулинов из сыворотки крови и определения их соотношения. Глобулины имеют большую молекулярную массу и менее гидрофильны, поэтому выпадают в осадок при 50% насыщении сульфатом аммония. Альбумины выпадают в осадок при 100% насыщении сульфатом аммония.

В норме соотношение альбумины/глобулины в сыворотке крови человека равно 1,5–2,3 и изменяться при патологии. Например, при воспалении, когда увеличивается содержание разных фракций глобулинов.

Разные соли обладают разной высаливающей способностью. В насыщенном растворе сульфата аммония выпадают в осадок практически все белки. Раствор NaCl осаждает белки слабее, чем сульфат аммония, вследствие меньшей дегидратирующей способ-

ности, которая характеризуется положением ионов в ряду Гофмейстера: F^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , I^- , CNS^- и Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ .

Реактивы

- 1) сыворотка,
- 2) насыщенный раствор $(NH_4)_2SO_4$,
- 3) порошок $(NH_4)_2SO_4$,
- 4) 10% раствор NaOH,
- 5) 1% раствор $CuSO_4$.

Проведение анализа

В пробирку вносят 3,0 мл сыворотки или яичного белка и добавляют равный объем насыщенного раствора сульфата аммония. Выпадает осадок глобулинов.

Через 5 мин осадок отделяют (фильтрованием или центрифугированием при 3 тыс. об./мин) и отбирают пробу для проведения биуретовой реакции.

В полученный фильтрат (надосадочную жидкость) добавляют измельченные кристаллы сульфата аммония до получения 100% насыщения.

Выпавший осадок альбуминов отфильтровывают и с конечным фильтратом проводят биуретовую реакцию.

По интенсивности биуретовой реакции судят о соотношении альбуминовой и глобулиновой фракции в сыворотке крови.

Оформление работы

Отмечают принцип методов, результаты проведения анализа. Указывают на возможность разделения белков методом высаливания, его отличия от осаждения путем денатурации.

В клинической практике применяют пробы коллоидоустойчивости белков плазмы, позволяющие определить изменение соотношения альбумин/глобулины. В норме белки плазмы крови находятся в виде коллоидов, что обеспечивается зарядом на поверхности белковой частицы и гидратной оболочкой.

Нарушение устойчивости можно вызывать уменьшением заряда (применение электролитов), снижением содержания гидратационной воды в коллоидах (органические растворители, концентрированные растворы электролитов, спирт), увеличение размера частиц (денатурация органическими кислотами, солями тяжелых металлов, нагревание).

При добавлении к сыворотке некоторых органических веществ (тимола, гепарина), или солей кальция также наступает преципитация белков, приводящая к помутнению или образованию хлопьев. Степень помутнения измеряют турбидиметрически.

Эти методы коллоидоустойчивости имеют скорее историческое значение, в настоящее время соотношение белковых фракций определяют методом электрофореза.

ТЕМА 2.3. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА В РАСТВОРЕ

Актуальность

Количественное определение белка в медико-биохимических исследованиях является одной из самых распространенных аналитических процедур. Умение корректно определять концентрацию белка актуально для клинической биохимии при оценке состояния белкового обмена и функций печени, для фармацевтической химии при контроле качества белково-лекарственных средств (вакцин, белковых препаратов крови, γ -глобулина), в научно-исследовательской практике для определения удельной активности ферментов и степени их очистки.

Цель

Изучить методы определения белка (методы Лоури, Бредфорд, биуретовый, микробиуретовый, спектрофотометрический), оценить области их применения, преимущества и недостатки; определить концентрацию белка в сыворотке крови биуретовым и спектрофотометрическими методами. Обсудить аналитические характеристики указанных методов: специфичность, чувствительность, воспроизводимость и правильность.

Необходимо знать:

1. Принципы методов определения концентрации белка. Возможности их применения.
2. Методы разделения белков плазмы крови.
3. Белковые фракции крови, их характеристика, функции, содержание в крови. Основные представители каждой фракции.
4. Патологические состояния, связанные с диспротеинемией (первичной и вторичной).
5. Роль печени в синтезе белков крови. Нормы содержания белка в плазме крови.

Необходимо уметь:

1. Анализировать преимущества и недостатки методов, обсуждать полученные результаты.
2. Правильно выбрать метод определения концентрации белка в зависимости от предполагаемой концентрации и аминокислот-

ного состава исследуемого биоматериала. Определить концентрацию белка.

3. Приготовить фосфатные буферы различной молярной силы.

Вопросы для самоподготовки:

1. Содержание белка в сыворотке и плазме крови. Истинные и ложные гипо- и гиперпротеинемии.
2. Белковые фракции сыворотки крови. Парипротейны.
3. Диспротеинемии, их причины, клиническое значение.
4. Белки острой фазы воспаления.
5. Методы количественного определения белка. Их сравнительная характеристика.
6. Методы разделения белковых фракций в биологическом материале.

Азотометрия

Принцип

Метод основан на полном разрушении белка под действием серной кислоты в присутствии катализатора (минерализации). Азот белка улавливается в форме сульфата аммония и определяется в виде аммиака после перегонки с паром гидролизата, подщелаченного добавлением концентрированного NaOH.

Аммиак определяют по методу Кьельдаля. В среднем содержание азота в белках равно 16%. Определив содержание азота в пробе, его количество умножают на коэффициент 6,25 (100/16) и получают содержание белка в исследуемом материале. Метод очень трудоемкий и недостаточно точный, так как содержание азота в разных белках колеблется от 14 до 19%.

В настоящее время не применяется и имеет только историческое значение.

Нефелометрия

Принцип

В основе метода лежит **измерение интенсивности светового потока, рассеянного при его прохождении через белковую взвесь или коллоидный раствор**. Используется специальный прибор – **нефелометр**. Расчет содержания белка в исследуемых пробах ведут по калибровочному графику, *построенному с помощью растворов белка с известной концентрацией (зависимость интенсивности светорассеивания от концентрации белка)*.

Метод может быть использован также для определения размеров и формы частиц.

Турбидиметрия

Принцип

Метод основан на измерении интенсивности светового потока, прошедшего через мутные (светорассеивающие) растворы: тонкие взвеси или коллоидные растворы. Измерение ведут с помощью лабораторного фотоколориметра. Метод используется для определения белковых фракций сыворотки крови. Для этого с помощью растворов фосфатного буфера различной концентрации осаждают определенные фракции белка в виде тонкой взвеси. Сумму оптических плотностей для всех фракций принимается за 100%.

Рефрактометрия

Принцип

Метод основан на неодинаковой способности различных сред преломлять проходящие через них лучи света. Степень рефракции обусловлена количеством, размерами и физическим состоянием растворенных частиц, а также температурой окружающей среды. В сыворотке крови рефракция обусловлена как количеством, так и качеством содержащихся в ней белков. Метод прост в исполнении, но неточен, так как рефракция сыворотки обуславливается также её минеральными компонентами и углеводами. Содержание белка вычисляют по показателю преломления и сравнивают с преломлением стандартного раствора белка.

$$\frac{\sin \alpha}{\sin \beta} = n$$

где: $\sin \alpha$ – угол падения, $\sin \beta$ – угол преломления, n – коэффициент преломления.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 1

Колориметрические методы определения белка

Биуретовый метод

Метод обладает высокой специфичностью, но низкой чувствительностью и используется в интервале концентраций белка в материале от 10 г/л до 100 г/л (предел обнаружения 0,3 г/л). Метод пригоден для определения концентрации белка в образцах с высоким содержанием белка, например, в сыворотке крови.

Принцип

В щелочной среде пептидная группировка переходит из кето- в

енольную форму. При этом атомы кислорода и азота каждой двух пептидных группировок связывают один ион меди. В результате развивается фиолетовое окрашивание, интенсивность которого прямо пропорциональна числу пептидных группировок, а следовательно, и количеству белка в пробе. Положительную биуретовую реакцию дают не только белки, но и пептиды. В последнем случае для протекания реакции необходимо наличие, по крайней мере, двух пептидных связей, то есть в материале должны содержаться, как минимум, трипептиды.

Биуретовый метод не проводят в присутствии солей аммония из-за образования медно-аммиачного комплекса. Метод специфичен, отличается хорошей воспроизводимостью. На правильность результатов влияет качество калибровочного графика и корректирование результатов по значению холостой пробы на реактивы и сыворотку. При работе с сывороткой крови завышают результаты повышенные концентрации билирубина (больше 85 мкМ) и триацилглицерола (больше 11,4 мМ).

Проведение анализа

Отмерить, мкл	Опытная проба	Калибровочная проба
Калибратор, раствор альбумина, 70 г/л	-	20
Проба, сыворотка крови	20	-
Биуретовый реактив	1000	1000

Пробы следует перемешать, выдержать 15 мин при комнатной температуре или 10 мин при 37 °С. Измеряют оптическую плотность опытных и калибровочных проб при длине волны 550 нм против слепой пробы, которую готовят, смешивая 20 мкл дистиллированной воды и 1000 мкл биуретового реактива.

Расчет концентрации белка в пробе рассчитывают по формуле:

$$C_{\text{калибратора}} / E_{\text{калибратора}} \times E_{\text{пробы}}$$

где: соотношение $C_{\text{калибратора}} / E_{\text{калибратора}}$ отражает коэффициент зависимости концентрации белка в калибровочном растворе и его оптической плотности в данном диапазоне концентраций.

Для построения калибровочного графика используют несколько стандартных растворов альбумина (35, 70 и 100 г/л) и обрабатывают их аналогично опытной пробе.

В норме диапазон концентрации общего белка в сыворотке крови составляет: 65–80 г/л.

Оформление работы

Отмечают принцип метода и результаты проведения анализа. В выводах рассматривают причины гипо- или гиперпротеинемии.

Микробиуретовый метод

Чувствительность метода почти в 100 раз выше, чем у биуретового метода. Микробиуретовый метод используется в интервале концентраций белка от 0,02 г/л до 0,53 г/л.

Реактивы

- 1) реактив Бенедикта: 17,3 г цитрата натрия и 10 г углекислого натрия растворяют при слабом подогревании в небольшом количестве воды. Полученный раствор смешивают с 10 мл раствора сульфата меди (1,73 г CuSO_4 в 10 мл дистиллированной воды). Объем смеси доводят дистиллированной водой до 100 мл,
- 2) 3% раствор NaOH,
- 3) исходный стандартный раствор альбумина, 1,0 г/л.

Проведение анализа

К 0,1 мл биологического материала (например, гомогенат ткани) добавляют 4 мл 3% раствора NaOH и 0,2 мл реактива Бенедикта. Раствор хорошо перемешивают и через 15 мин фотометрируют при длине волны 330 нм против слепой пробы (0,1 мл H_2O , 4 мл щелочи и 0,2 мл реактива Бенедикта).

Построение калибровочного графика

Из каждого разведения отбирают в отдельную пробирку по 0,1 мл пробы, добавляют по 4,0 мл 3% раствора NaOH и 0,2 мл реактива Бенедикта. Содержимое пробирок перемешивают. Через 15 мин пробы фотометрируют при длине волны 330 нм против слепой пробы.

Приготовление растворов белка для калибровочного графика

№ пробы	Исходный стандартный раствор альбумина, 1,0 г/л, мл	3% раствор NaOH, мл	Концентрация белка в пробах для калибровки, г/л
1	0,2	0,8	0,2
2	0,4	0,6	0,4
3	0,6	0,4	0,6
4	0,8	0,2	0,8
5	1,0	-	1,0

Метод Лоури

Метод следует применять для определения низких концентраций белка: от 10 до 100 мкг в пробе (например, экстракты тканей при экспериментальных исследованиях). Чувствительность метода составляет 0,2 мкг белка. Линейная зависимость экстинкции от концентрации белка находится в пределах от 15 мкг до 40 мкг белка в пробе.

Принцип

Метод основан на образовании окрашенных продуктов взаимодействия ароматических аминокислот белка с реактивом Фолина в сочетании с биуретовой реакцией на пептидные связи. По сравнению с биуретовым методом, метод Лоури менее специфичен, т.к. интенсивность окраски зависит от аминокислотного состава белка, особенно от содержания тирозина и триптофана, в меньшей степени от присутствия цистеина, цистина, гистидина, а так же от последовательности расположения аминокислот и степени экранирования функциональных групп. На развитие окраски влияют многие вещества, которые широко используются при выделении и очистки белка: компоненты буферных систем, сульфгидрильные и другие восстанавливающие агенты, ЭДТА, детергенты, сернокислый аммоний, сахароза и др. Поэтому при построении калибровочного графика для определения белка по методу Лоури растворитель для стандартного вещества должен содержать те же компоненты, что и анализируемые пробы.

Реактивы

1. Реактив 1: 2% раствор Na_2CO_3 в 0,1н растворе NaOH .
2. Реактив 2: 0,5% раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1% растворе цитрата натрия.
3. Рабочий раствор: 1 мл реактива 2 смешивают с 50 мл реактива 1. Рабочий раствор готовят в день исследования.
4. Реактив Фолина: 10 г $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ и 2,5 г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ помещают в круглодонную колбу на 250 мл, приливают 70 мл воды и хорошо перемешивают. К полученному раствору добавляют 5 мл 85% фосфорной кислоты и 10 мл концентрированной соляной кислоты. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и кипятят в течение 10 ч. Затем в раствор добавляют 15 г LiSO_4 , 5 мл воды и одну каплю брома. Раствор охлаждают, доводят водой до 100 мл, фильтруют и разводят водой до получения 1н раствора кислоты (приблизительно в 2 раза). Для этого кислотность реактива определяют предварительно, титруя разведенный в 10 раз реактив 0,1н щелочью в присутствии фенолфталеина.
5. Основной калибровочный раствор альбумина, 0,2 г/л.

Проведение анализа

В пробирку вносят 0,4 мл исследуемого раствора, содержащего 10–100 мкг белка, добавляют 2,0 мл рабочего раствора и перемешивают. Через 10 мин добавляют 0,2 мл реактива Фолина. Содержимое пробирки снова тщательно перемешивают и через 30 мин фотометрируют при длине волны 750 нм.

Приготовление растворов белка для калибровочного графика

№ пробы	Основной калибровочный раствор альбумина, мл	Дистиллированная вода, мл	Концентрация белка в калибровочных пробах, г/л
1	0,1	0,3	0,05
2	0,2	0,2	0,10
3	0,3	0,1	0,15
4	0,4	-	0,20

Пробы для калибровочного графика обрабатываются, как описано выше.

Метод Бредфорд

Этот метод в наибольшей мере пригоден для определения очень малых концентраций белка, например, в экстрактах субклеточных фракций. Метод Бредфорд почти в 4 раза более чувствительным, чем метод Лоури. Оптимальный диапазон концентрации белка для данного метода лежит в интервале от 0,5 до 50 мкг в пробе.

Принцип метода

Синтетический краситель **Кумасси бриллиантовый голубой G-250** изменяет свои оптические свойства при связывании с белком, что позволяет селективно выделять оптический сигнал сорбированного красителя, даже при значительном преобладании в растворе свободной формы красителя. В отличие от метода Лоури, окраска не зависит от соединений, которые широко используются в биохимических исследованиях: KCl, MgCl₂, NaCl, тритона, додецилсульфат натрия, мочевины, сахарозы. К недостаткам метода относится некоторая нелинейность зависимости оптической плотности от содержания белка. Причиной этого является перекрывание спектров поглощения двух форм красителя: связанной (синяя окраска) и несвязанной (оранжевая окраска). Кроме того, связывание красителя зависит от аминокислотного состава белка (особенно от содержания гистидина, лизина, аргинина), молекулярной массы, конформации белковой молекулы. Чтобы устранить эти недостатки, для приготовления калибровки используют белок, близкий по аминокислотному

составу анализируемому белку. Искажению результатов способствует осаждение комплекса красителя с белком на стенках кюветы, поэтому необходимо ежедневно промывать кюветы детергентом либо замачивать их в 1н. растворе HCl.

Реактивы

1. Рабочий раствор красителя: 100 мг Кумасси бриллиантового голубого G-250 (0,01%), 59 мл 95 этанола (4,7%), 100 мл 85% ортофосфорной кислоты (8,5%) в 1 литре воды. Раствор профильтровать.
2. Исходный стандартный раствор альбумина, 0,1 г/л.

Проведение анализа

К 1,0 мл исследуемой материала добавляют 5,0 мл рабочего раствора Кумасси G-250, содержимое пробирок перемешивают и через 2 минуты фотометрируют при длине волны 595 нм против слепой пробы, в которой материал заменяют 1,0 мл дистиллированной воды.

Построение калибровочного графика

№ пробы	Исходный стандартный раствор альбумина, мл	Дистиллированная вода, мл	Рабочий раствор Кумасси G-250, мл	Концентрация белка в калибровочной пробе, г/л
1	0,2	0,8	5,0	0,02
2	0,4	0,6	5,0	0,04
3	0,6	0,4	5,0	0,06
4	0,8	0,2	5,0	0,08
5	1,0	-	5,0	0,10

Содержимое пробирок с разведениями для построения калибровочного графика перемешивают и через 2 мин фотометрируют при длине волны 595 нм против слепой пробы.

Для определения малых концентраций белка, например, в моче или спинномозговой жидкости, применяют колориметрический метод с пиррогалоловым красным и молибдатом аммония.

Определение концентрации отдельных белков предполагает использование специфических реагентов, например, бромкрезоловый зелёный для альбумина.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 2 **Спектрофотометрический метод определения концентрации белка**

Метод используется для анализа биоматериала с концентрацией белка в пробе в интервале от 0,015 г/л до 0,045 г/л. Метод можно использовать и для анализа сыворотки, предварительно разведя ее в 100–1000 раз физиологическим раствором, поскольку в цельной сыворотке концентрация общего белка чрезвычайно высока: 63–84 г/л. Однако спектрофотометрический метод предпочтительнее использовать для определения концентрации белка в эксперименте (в биологических образцах с низким содержанием белка) или в порциях элюатов, собранных с помощью хроматографической колонки. Поскольку спектрофотометрический метод не требует добавления к образцу каких-либо реагентов, то порция элюата, после её спектрофотометрирования, остаётся неизменённой и может быть использована в любых дальнейших исследованиях.

Принцип

Белки обладают способностью поглощать световой поток в ультрафиолетовой области спектра за счет входящих в их состав ароматических аминокислот, прежде всего триптофана и тирозина. Оптическая плотность раствора белка будет прямо пропорциональна концентрации белка. Условно принято считать, что при концентрации белка в растворе 1,0 мг/мл, величина оптической плотности, измеренной при длине волны 280 нм в кювете толщиной 1,0 см, равна 1,0.

Содержащий белок образец, может быть загрязнен нуклеиновыми кислотами. Эти молекулы также поглощают световой поток ультрафиолетовой области спектра: максимум поглощения приходится на длину волны 260 нм, что обусловлено присутствием азотистых оснований. Для устранения погрешности в оценке концентрации белка в таких образцах, спектрофотометрирование раствора проводят при двух длинах волн: 260 и 280 нм.

Спектрофотометрический метод имеет широкое применение в аналитической химии при выделении и контроле чистоты белковых фракций, а также в энзимологии для оценки чистоты очищенного фермента. Если фермент выделен в чистом виде, то можно определить какая величина оптической плотности будет соответствовать, например, 1 мг данного фермента. Пользуясь этим соотношением, можно определить концентрацию фермента, используя спектрофотометрический метод.

Проведение анализа

Сыворотку крови разводят в 100–1000 раз 0,9% раствором NaCl (физиологическим раствором). Бесцветный и прозрачный раствор помещают в кварцевую кювету спектрофотометра. Определяют оптическую плотность при длине волны 280 нм 260 нм против слепой пробы, которой служит физиологический раствор. Расчет содержания белка, с поправкой на потенциально возможное загрязнение нуклеиновыми кислотами, проводят по формуле Калькара:

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

где: E_{260} и E_{280} – оптические плотности (экстинкции) измеренные при соответствующих длинах волн; **1,45** и **0,74** – эмпирические коэффициенты.

Оформление работы

Отмечают принцип метода, результаты проведения анализа.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 3

Разделение фракций белков сыворотки крови

Состав и количество фракций белков в биологических жидкостях зависит от применяемого метода фракционирования:

1. **Осаждение нейтральными солями.** В основе метода лежит способность белков плазмы, имеющие разную молекулярную массу, выпадать в осадок при воздействии на них растворов солей различных концентраций.
2. **Электрофоретическое фракционирование.** Различают несколько типов электрофореза в зависимости от поддерживающей среды. В качестве поддерживающих сред используют бумагу, пленку из ацетата целлюлозы, агаровый, полиакриламидный и крахмальный гели. При проведении электрофореза необходимо учитывать факторы, влияющие на подвижность разделяемых веществ:
 - знак и величина электрического заряда разделяемых молекул (зависит от pH буфера);
 - размер и форма (глобулярная или фибриллярная) молекул;
 - напряженность постоянного электрического поля между катодом и анодом камеры для электрофореза. Так, скорость миграции ионов разделяемой смеси прямо пропорциональна напряженности поля и силе тока (обусловлена переносом ионов буфера и образца) и обратно пропорциональна электрическому сопротивлению (зависит от типа и размеров носителя и ионной силы буфера);

- химический состав буфера и его концентрация, значению pH и ионная сила;
 - свойства материала носителя: его гидрофильность, способность адсорбировать разделяемые молекулы, электроосмос и диффузия.
3. **Иммунологические методы.** В их основе лежит учет иммунных свойствах белковых фракций.
 4. **Осаждение этиловым спиртом при низкой температуре.**
 5. **Седиментационный анализ.** Основан на различной зависимости скорости оседания (седиментации) белков от их массы и размеров молекулы.
 6. **Иммуноэлектрофорез, электроиммунодиффузия, радиальная иммунодиффузия, радиоиммунный анализ.**
 7. **Хроматография:** ионообменная, адсорбционная, аффинная, гель-фильтрация.

Определение белковых фракций сыворотки крови турбидиметрическим экспресс-методом

Метод доступен, дешев, позволяет выявить 5 белковых фракций в сыворотке крови. Позволяет изучить принцип турбидиметрии. В научной и клинической практике уже не применяется.

Принцип

Фосфатные буферы разной молярной концентрации и ионной силы осаждают соответствующие фракции белка. При этом более концентрированные буферы осаждают мелкодисперсные фракции белка. О концентрации осажденной фракции белка судят по степени мутности их растворов.

Реактивы

Тщательность приготовления реактивов имеет очень большое значение для получения точных и воспроизводимых результатов.

1. Основной фосфатный буфер: 33,5 г NaOH и 226,8 г KH_2PO_4 последовательно (сначала полностью растворить навеску щелочи, затем - фосфата калия) разводят в дистиллированной воде и доводят объем раствора в мерной колбе до 500 мл.
2. Рабочие буферы:
 - буфер I – 123,5 мл основного буфера доводят водой до 100 мл;
 - буфер II – 100,0 мл основного буфера доводят водой до 100 мл;
 - буфер III – 94,5 мл основного буфера доводят водой до 100 мл;
 - буфер IV – 78,5 мл основного буфера доводят водой до 100 мл;
 - буфер V – 65,0 мл основного буфера доводят водой до 100 мл.

Проведение анализа

В отдельной пробирке готовят смесь из 0,5 мл сыворотки, 0,75 мл воды, 3,75 мл основного буфера. В пробирки с номерами от 1 до 5 наливают по 5 мл соответствующих рабочих буферов (I–V) и добавляют по 0,5 мл смеси. Тщательно перемешивают и колориметрируют через 15 мин на фотоколориметре на красном светофильтре в кювете толщиной 1,0 см против контроля, содержащего 0,5 мл смеси и 5 мл воды.

Расчет:

$$E_{\text{альб.}} = E_1 - E_2$$

$$E_{\alpha_1\text{-глоб.}} = E_2 - E_3$$

$$E_{\alpha_2\text{-глоб.}} = E_3 - E_4$$

$$E_{\beta\text{-глоб.}} = E_4 - E_5$$

$$E_{\gamma\text{-глоб.}} = E_5$$

Сумму оптических плотностей, определенных для пяти фракций (**$E_{\text{альб.}}$ + $E_{\alpha_1\text{-глоб.}}$ + $E_{\alpha_2\text{-глоб.}}$ + $E_{\beta\text{-глоб.}}$ + $E_{\gamma\text{-глоб.}}$**), принимается за 100% и рассчитывается относительное содержание отдельных фракций.

Зная содержание общего белка в сыворотке, выражают результаты в г/л.

Содержание белковых фракций в сыворотке крови в норме

	Альбумин	50–70%	30–50 г/л
	α_1 -глобулины	3–6%	1–3 г/л
	α_2 -глобулины	9–15%	6–10 г/л
	β -глобулины	8–18%	7–11 г/л
	γ -глобулины	15–25%	8–16%
Соотношение альбумин/глобулины = 1,5–2,3			

Оформление работы

Отмечают принцип метода, результаты проведения анализа. В выводах рассматривают причины диспротеинемии.

ТЕМА 2.4. СЛОЖНЫЕ БЕЛКИ

Актуальность

Сложные белки – это разновидность белков, молекулы которых содержат кроме белковой части (апо-часть), простетическую группу: небелковую органическую структуру (например: порфириновую структуру, углеводный или липидный компоненты), или неорганическую (атом металла), которые соединены с апо-частью ковалент-

ными или слабыми (ионными, водородными, вандер-ваальсовыми) связями. Сложные белки – хромопротеины, металлопротеины, гликопротеины, липопротеины, нуклеопротеины – выполняют самые разнообразные функции в организме: транспорт различных веществ, рецепция и связывание лигандов, хранение и передача наследственной информации и т. д. Изучение структуры, особенностей строения этих макромолекул необходимо для понимания их роли в организме, разработки методов выделения, очистки и количественного определения гемоглобина, липопротеинов, нуклеиновых кислот из тканей.

Цель

Изучить структуру и химические свойства гемопротеинов, нуклеопротеинов и гликопротеинов.

Необходимо знать:

1. Ферментные и неферментные гемопротеины.
2. Структуру гема. Особенности строения гемоглобина и миоглобина.
3. Представители хромопротеинов. Структуру ФАД и ФМН.
4. Строение и функции гликопротеинов. Роль гликозилирования в изменении свойств белковых молекул.
5. Нуклеопротеины, их функции и структурные компоненты.
6. Фосфопротеины, строение, функции. Роль фосфорилирования в изменении структуры и функции белков.
7. Липопротеины, классы, соотношение основных компонентов, функции.
8. Роль гликозилирования в функционировании белковых структур.

Вопросы для самоподготовки:

1. Понятие «сложные белки». Простетические группы, их роль. Связи между простетическими группами и полипептидными последовательностями.
2. Нуклеопротеины, структура молекул, функции.
3. Хромопротеины, гемопротеины, флавопротеины.
4. Структура гемоглобина и миоглобина. Механизм транспорта газов гемоглобином.
5. Гликопротеины. Важнейшие представители.
6. Фосфопротеины. Казеин, структура, свойства, функции.
7. Липопротеины, структура, типы, функции. Гипер- и дислипотеинемии.

Задание: Составьте таблицу «Классификация и структура сложных белков, примеры белков и их функции».

РАЗДЕЛ 3

ВНЕШНИЙ И ПРОМЕЖУТОЧНЫЙ ОБМЕН БЕЛКОВ

В обмене веществ выделяют внешний и промежуточный (внутриклеточный) этапы. Внешним этапом является процесс пищеварения, осуществляемый каскадом гидролитических ферментов, экскретируемых в кишечник соответствующими железами и активирующихся в ходе лимитированного протеолиза. Суть этого процесса заключается в лишении экзогенных пищевых биополимеров видоспецифичности и антигенности и подготовки к всасыванию в виде мономеров. Так, продуктами гидролиза белков являются аминокислоты, для всасывания которых в энтероцитах существуют специфические транслоказы и гамма-глутамилтранспептидазный механизм.

Внутриклеточный метаболизм аминокислот представлен универсальными механизмами окисления, декарбоксилирования и переаминирования и специфическими превращениями по радикалу.

Синтез заменимых аминокислот происходит на базе кетокислот в ходе восстановительного аминирования или переаминирования. Цистеин и тирозин возникают на основе поступающих незаменимых метионина и фенилаланина, соответственно. Аргинин образуется в орнитиновом цикле синтеза мочевины. И только глицин может синтезироваться *de novo* из CO_2 и H_2O .

ТЕМА 3.1. ВНЕШНИЙ ОБМЕН БЕЛКОВ

Актуальность

Благодаря ряду специфических функций белков (пластическая, каталитическая, сократительная, защитная, регуляторная) и их высокой видовой специфичности, метаболизм белков занимает особое место среди других видов обмена. В результате большого разнообразия и разветвленности реакций азотистого обмена образуются различные низкомолекулярные продукты: мочевина, свободные аминокислоты, креатинин, аммонийные соли, аммиак.

Цель

Знакомство со строением низкомолекулярных продуктов азотистого обмена, процессами их синтеза и обезвреживания. Изучение механизмов основных реакций обмена аминокислот, ферментов, участвующих в этих процессах.

Необходимо знать:

1. Ферменты, принимающие участие в переваривании белков, механизмы их активации. Специфичность ферментов.
2. Соединения, образующиеся в результате распада белков в кишечнике.
3. Механизмы обезвреживания токсичных веществ в печени.

Необходимо уметь:

1. Определить кислотность желудочного сока.
2. Дать клинико-диагностическую оценку полученным результатам.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

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

В работе последовательно исследуются образцы нормального и трех типов патологического желудочного сока. Сначала необходимо провести качественные реакции на свободную HCl (лабораторная работа 3) – если бумага «конго» приобретает фиолетовую, а диметиламиноазобензол оранжево-красную окраску, то в одной порции желудочного сока определяют все виды кислотности, как описано ниже. Если бумага «конго» остается красной, а диметиламиноазобензол окрашивает содержимое колбы в желтый цвет, то в этом образце можно определить только общую кислотность в присутствии фенолфталеина.

Принцип

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

Реактивы

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

Материал исследования:

Нормальный желудочный сок, образцы патологического желудочного сока.

Проведение анализа:

1. В коническую колбу помещают 5 мл исследуемого желудочного сока, добавляют по 2 капли диметиламиноазобензола и фенолфталеина. В присутствии свободной HCl наблюдается красное окрашивание, в отсутствие кислоты – желтое.
2. Титруют 0,1н раствором NaOH до появления оранжево-красной окраски и отмечают объем щелочи (мл), пошедшей на титрование свободной HCl – 1 пункт титрования.
3. Продолжают титрование до появления лимонно-желтой окраски и снова отмечают объем щелочи (мл), израсходованной с начала титрования – 2 пункт титрования.
4. Затем титрование продолжают до появления розовой окраски и отмечают количество щелочи (мл), пошедшее на все титрование – 3 пункт титрования.

Расчет

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

$$40 \text{ ТЕ} = 40 \text{ ммоль/л.}$$

Пример расчета:

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

а) содержание свободной HCl будет равно:

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

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

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

в) содержание связанной HCl составит:

$$54 - 40 = 14 \text{ ммоль/л}$$

г) общая кислотность будет равной:

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

Кислотность в норме

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

Практическое значение

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

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

Пониженная кислотность (гипохлоргидрия) встречается при гипоацидном гастрите, иногда при язвенной болезни желудка.

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

Образец таблицы для оформления результатов

Образец желудочного сока	Количество NaOH, израсходованное на титрование, мл			Соляная кислота, моль/л		Общая кислотность
	1 пункт	2 пункт	3 пункт	Свободная	Связанная	
Нормальный						
Патологический						

Отмечают принцип метода. Делают вывод о наличии свободной соляной кислоты и о возможных патологиях. Существует беззондовый щадящий метод определения кислотности желудочного сока.

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

ТЕМА 3.2. ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ

Необходимо уметь:

1. Определять активность аминотрансфераз.
2. Определять содержание конечных продуктов белкового обмена.

Необходимо знать:

1. Внутриклеточный протеолиз.
2. Общие пути катаболизма аминокислот.
3. Соединения, образующиеся в результате распада белков в клетках организма. Аммиак, пути его обезвреживания. Роль дикарбоновых аминокислот. Орнитиновый цикл синтеза мочевины. Аммиогенез в почках.
4. Реакции косвенного снижения концентрации аммиака (синтез креатина, глутатиона, карнитина), реакции переаминирования аминокислот.

Вопросы для самоподготовки:

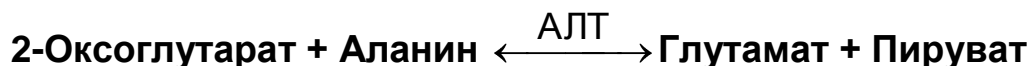
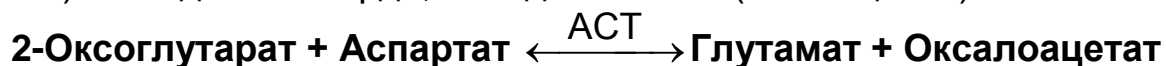
1. Внутриклеточный протеолиз: локализация, ферменты, их виды, специфичность действия, биологическое значение протеиназ.
2. Реакции прямого и непрямого дезаминирования аминокислот.
3. Дезаминирование серина, треонина и гистамина.
4. Механизм глутаматдегидрогеназной реакции.
5. Восстановительное аминирование кетокислот.
6. Глюкогенные и кетогенные аминокислоты.
7. Реакции трансаминирования аминокислот. Ферменты, участвующие в этом процессе. Роль пиридоксина.
8. Реакции декарбоксилирования аминокислот. Ферменты, кофакторы. Образование биогенных аминов (гистамин, ГАМК, серотонин, катехоламины). Обезвреживание биогенных аминов.
9. Соединения, образующиеся в результате распада белков. Фракции остаточного азота.
10. Синтез креатина. Роль креатинфосфата. Образование креатина.
11. Аммиак, пути его образования и обезвреживания: амиды, азотистые основания, аммонийные соли, аминокислоты, мочевина. Транспортные формы аммиака в крови.
12. Орнитиновый цикл синтеза мочевины.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Определение активности аминотрансфераз в сыворотке крови методом райтмана-френкеля

В сыворотке крови человека наибольшей активностью облада-

ют две аминотрансферазы: аспартатаминотрансфераза (L-аспартат: 2-оксоглутарат-аминотрансфераза, **АСТ**, КФ 2.6.1.1.) и аланинаминотрансфераза (L-аланин:2-оксоглутарат-аминотрансфераза, **АЛТ**, КФ 2.6.1.2.). В клинической практике чаще всего определяют именно активность этих двух ферментов. Высокая **удельная активность** этих аминотрансфераз в соответствующих органах позволяет считать трансаминазы маркерными ферментами (показателями цитолиза): АСТ для миокарда, АЛТ для печени (гепатоцитов):



Удельная активность фермента – активность, пересчитанная на 1 мг белка исследуемой ткани или объем жидкости (л, мл), относительно постоянного состава. Корректное сравнение активности одного и того же фермента в различных тканях организма возможно только, когда активность фермента выражена в **единицах удельной активности**.

Наибольшая удельная активность АСТ обнаружена в миокарде, затем в порядке убывания – в печени, скелетных мышцах, головном мозге и почках. Удельная активность АЛТ максимальна в печени, среди других органов убывает в последовательности: поджелудочная железа, сердце, скелетные мышцы, селезенка и легкие.

Определение активности аминотрансфераз в сыворотке крови методом Райтмана–Френкеля

Принцип

В основе лежит образование в щелочной среде окрашенного комплекса 2,4-динитрофенилгидразина с оксалоацетатом и пироватом, являющимися продуктами реакций переаминирования. Активность ферментов выражают в микромолях пировата, поскольку оксалоацетат спонтанно декарбоксилируется до пировата.

Реактивы

- 1) забуференный раствор субстрата АСТ: смесь 2-оксоглутаровой кислоты и DL-аспарагиновой кислоты (или L-аспарагиновой кислоты),
- 2) забуференный раствор субстрата АЛТ: смесь 2-оксоглутаровой кислоты и DL-аланина (или L-аланина),
- 3) раствор 2,4-динитрофенилгидразина в 1 М НСl,
- 4) 0,4 М раствор NaOH,
- 5) 1,0 мкМ калибровочный раствор пировиноградной кислоты.

*Построение калибровочного графика
для определения активности аминотрансфераз*

№ пробирки	Калибратор. Раствор пировиноградной кислоты, мкл	Вода, мкл	Р 1, субстрат для АСТ или АЛТ	Активность фермента		
				Е/л	ммоль/л/ч	мккат/л
0	-	100	500	-	-	-
1	25	100	475	6,25	0,375	0,104
2	50	100	450	12,5	0,75	0,208
3	100	100	400	25,0	1,50	0,417
4	200	100	300	50,0	3,00	0,833

Пробы перемешать, добавить по 0,5 мл **Р 2** (2,4-динитрофенилгидразин), перемешать и выдержать 20 мин при комнатной температуре (18–25 °С). Добавить по 5 мл рабочего раствора **Р 3** (гидроокись натрия) и оставить на 10 мин при комнатной температуре для развития окраски. Измерить оптическую плотность проб против дистиллированной воды при длине волны 490 нм.

Калибровочный график построить, откладывая по оси ординат разность оптических плотностей опытных и контрольной пробы (пробирка 0), а по оси абсцисс – соответствующие им значения активности ферментов.

Измерить оптическую плотность опытных и контрольной (холостой) проб против дистиллированной воды при длине волны 490 нм. Окраска стабильна в течение 30 мин. При использовании кюветы объемом 5 мл увеличить объемы вносимых компонентов в 2 раза.

Определение активности аминотрансфераз по представленной выше схеме, называют определением активности фермента **по конечной точке**. Это означает, что учет количества образующихся продуктов реакции проводят после инкубации пробы сыворотки *in vitro* в течение определенного времени – в течение 60 мин. Чем выше будет активность сывороточных ферментов, тем больше за одно и то же время инкубации образуется продуктов реакции.

Расчет

Расчет активности АСТ производят по калибровочному графику. Для этого на оси ординат отмечают разницу оптических плотностей опытных и контрольной пробы, а на оси абсцисс находят соответствующие им значения активностей АСТ.

Ход проведения анализа

Отмерить, мкл	Опытная проба	Контрольная (холостая) проба
Р 1 , субстрат для АСТ или АЛТ	250	250
Выдержать при температуре 37 °С в течение 5 мин		
Проба	50	-
Вода дистил.	-	50
Перемешать и выдержать при температуре 37 °С в течение 60 мин		
Р 2 , 24-динитрофенилгидразин	250	250
Перемешать и выдержать при температуре 18–25 °С в течение 20 мин		
Рабочий раствор Р 3 , раствор натрия гидроокиси	2500	2500
Перемешать и выдержать при температуре 18–25 °С в течение 10 мин		

Активность аминотрансфераз в сыворотке крови человека в норме:

Активность АЛТ	28–190 нмоль/с·л или 0,1–0,68 ммоль/ч·л
Активность АСТ	28–130 нмоль/с·л или 0,1–0,45 ммоль/ч·л

Коэффициент де Ритиса (активность АСТ / активность АЛТ) = $1,33 \pm 0,40$.

Практическое значение:

Особое клиническое значение имеет определение активности аминотрансфераз в сыворотке крови для диагностики заболеваний печени. Повреждение и некроз (цитолиз) части печеночных клеток любой этиологии (острый гепатит и обострение хронического гепатита, холестатическая и обтурационная желтухи, лекарственно-индуцированное поражение печени и др.) сопровождается нарушением или полной потерей барьерной функции клеточных мембран, что приводит к повышению её проницаемости для внутриклеточных белков, в том числе ферментов. Молекулы ферментов выходят в межклеточные пространства, а затем – в кровь. Повышение активности внутриклеточных ферментов в сыворотке крови отражает **синдром цитолиза**. По этой причине активности обеих аминотрансфераз в сыворотке крови увеличиваются. В связи с тем, что удельная активность АЛТ в печени выше, чем удельная активность АСТ, активность АЛТ в сыворотке крови увеличивается в большей степени, чем АСТ. Это лежит в основе того, что при вышеперечис-

ленных патологиях печени типичным является снижение коэффициента де Ритиса (АСТ/АЛТ), который становится меньше 1,33.

Определение активности АСТ в сыворотке крови может быть использовано в качестве теста для **подтверждения диагноза** инфаркта миокарда. В случае инфаркта миокарда активность АСТ возрастает через 4–6 часов от начала ангиоанального приступа, спустя 24–36 часов достигает максимума и нормализуется на 3–7 день. Поскольку активность АСТ в сыворотке крови является **медленно-реагирующим показателем повреждения кардиомиоцитов**, для **диагностики инфаркта миокарда** в современной клинической биохимии используют другие, более информативные и кардиоспецифичные биохимические тесты.

Оформление работы

Отмечают принцип метода, результаты проведения анализа. Делают вывод о возможных патологиях.

Определение активности аминотрансфераз в сыворотке крови проводят также с помощью **кинетического метода (УФ-метода)**. Для этого используют специальные лабораторные тест-системы (наборы), например: **«АСТ (АЛТ)-УФ-НОВО»**.

Принцип кинетического метода состоит в регистрации скорости окисления НАДН в системе сопряженных реакций, проводимых непосредственно в кювете спектрофотометра. При этом количество молей окисленного НАД⁺ будет равно количеству молей аспартата, восстановленного до малата с участием НАДН (в случае АЛТ пируват восстанавливается до лактата). В ходе сопряженных реакций НАДН окисляется, превращаясь в НАД⁺, что приводит к **снижению экстинкции пробы, измеряемой при длине волны 340 нм**. Скорость окисления НАДН будет прямо пропорциональна активности фермента в пробе. Количество окисленного НАД⁺ за 1 минуту вычисляют по величине молярного коэффициента экстинкции для НАДН, который равен $6,22 \times 10^3$ моль/л × см. Очевидно, что этот кинетический метод назван **УФ-методом** потому, что длина волны 340 нм относится к ультрафиолетовому (УФ) диапазону светового излучения.

Набор предназначен для проведения анализа на биохимических полуавтоматических и автоматических анализаторах.

Кинетические методы определения активности ферментов **более точны**, по сравнению с методами, с помощью которых активности фермента ведут по конечной точке.

ТЕМА 3.3. КОНЕЧНЫЕ ПРОДУКТЫ БЕЛКОВОГО ОБМЕНА

В крови выявляются несколько фракций низкомолекулярных азотсодержащих продуктов распада белков: мочевины (примерно 50%), креатинина (7,5%), аминокислот (около 25%), полипептидов, нуклеотидов и азотистых оснований (5%), мочевой кислоты (4%), аммиака и индикана (0,5%).

Определение концентрации этих веществ в плазме крови и моче дает представление о состоянии белкового обмена в целом и роли печени и почек в образовании и выведении этих метаболитов.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 1

Определение концентрации мочевины диацетилмонооксимным методом

Принцип

Колориметрический метод определения мочевины основан на её способности образовывать с диацетилмонооксимом, в присутствии тиосемикарбазида и солей железа в кислой среде, окрашенного соединения.

Реактивы

1. 10% раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ).
2. 5% основной раствор хлорного железа (FeCl_3).
3. Рабочий раствор хлорного железа: 1 мл его основного раствора доводят до 100 мл водой и добавляют 8 мл концентрированной H_2SO_4 и 1 мл 85% ортофосфорной кислоты.
4. Цветной реактив: 30 мл рабочего раствора FeCl_3 смешивают с 20 мл дистиллированной воды, 1 мл 2,5% раствора диацетилмонооксима и 0,25 мл 0,25% раствора тиосемикарбазида. Реактив готовят *ex tempore* (то есть непосредственно перед использованием реактива).
5. 7,0 ммоль/л стандартный раствор мочевины, приготовленный на 0,2% бензойной кислоте.

Расчет

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

где: $E_{\text{оп}}$ и $E_{\text{ст}}$ – оптические плотности опыта и стандарта мочевины соответственно; $C_{\text{ст}}$ – оптическая плотность стандарта мочевины.

Ход проведения анализа

Реагенты	Опыт, мл	Стандарт, мл	Контроль, мл
Дистиллированная вода	0,8	0,8	-
Сыворотка или моча (мочу развести – 1:25 или 1:50)	0,2	-	-
ТХУ	1,0	1,0	-
Стандарт мочевины	-	0,2	-
	Содержимое пробирок перемешивают, выдерживают 15–20 мин и пробы центрифугируют при 3000 об./мин в течение 10 мин.		
Надосадочная жидкость	0,5	0,5	-
Дистиллированная вода	-	-	0,5
Цветной реактив	5,0	5,0	5,0
	Пробы выдерживают 20 мин в кипящей водяной бане и охлаждают под проточной водой. Измеряют оптическую плотность опытной и стандартной проб против контроля при длине волны 530–560 нм не позже, чем через 15 мин после охлаждения.		

Концентрация мочевины в норме:

Сыворотка	дети	1,8–6,4 ммоль/л
	взрослые	2,5–8,3 ммоль/л
Моча		330–580 ммоль/сутки

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 2

Определение мочевины уреазным методом

Принцип метода

Мочевина под действием уреазы разлагается на углекислый газ и аммиак. Аммиак в реакции с натрия салицилатом и натрия гипохлоритом в присутствии натрия нитропруссиды образует окрашенный продукт, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации мочевины в пробе.

Ход проведения анализа

Отмерить, мкл	Опытная проба	Стандартная проба	Контрольная (холостая) проба
Рабочий реагент, раствор уреазы в фосфатном буфере, салицилат натрия и нитропруссид натрия	1000	1000	1000
Проба, сыворотка крови или моча, разведенная в 50 раз	10	-	-
Дистил. вода	-	-	10
Калибратор, раствор мочевины, 8,33 ммоль/л	-	10	-

Содержимое проб перемешивают и через 5 мин инкубации при +37 °С, добавляют по 200 мкл раствора № 3 (**Р 3**), раствора гипохлорита натрия и гидроокиси натрия. Измеряют оптическую плотность опытных и калибровочных проб против контрольной (холостой) пробы при длине волны 578 нм.

Расчет

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

где: $E_{\text{оп}}$ и $E_{\text{ст}}$ – оптические плотности опыта и стандарта мочевины соответственно; $C_{\text{ст}}$ – оптическая плотность стандарта мочевины.

Концентрация мочевины в норме:

Сыворотка крови	2,5–8,3 ммоль/л
Моча	430–710 ммоль/сут

Практическое значение

Концентрация мочевины в крови зависит от соотношения скоростей её синтеза в печени и выделения через почки, а также от активности катаболизма белков.

Повышение концентрации мочевины в сыворотке крови может наблюдаться при нарушении функции почек, истощении запасов воды в организме, повышенном катаболизме белка, при диете с высоким содержанием белка. Снижение концентрации мочевины отмечается при диете с низким содержанием белка, при повышенной утилизации белка в тканях (поздние сроки беременности), тяжелых заболеваниях печени, сопровождающихся нарушением синтеза мочевины (паренхиматозная желтуха, цирроз печени).

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 3
Определение креатинина в сыворотке крови
методом Поппера

Наиболее распространенными методами определения концентрации креатинина являются колориметрические, основанный на реакции Яффе – реакции ароматических нитровеществ (пикриновая кислота) с веществами, содержащими активную метиленовую ($=CH_2$) или метиновую ($\equiv CH$) группы. Методы отличаются по способу осаждения белков плазмы или сыворотки (вольфраматом натрия, пикриновой кислотой или трихлоруксусной кислотой). Эти методы недостаточно специфичны, поскольку в той же области спектра поглощают другие хромогены, такие как пикраты пировиноградной и ацетоуксусной кислоты, ацетона, глюкозы, производных креатинина.

Метод с осаждением белков при помощи пикриновой кислоты (метод Поппера) является наиболее точным, так как при этом часть креатиноподобных хромогенов, вероятно, удаляются.

Принцип метода

Креатинин в щелочной среде дает цветную реакцию с пикриновой кислотой (реакция Яффе).

Ход проведения анализа

Отмерить, мкл	Опытная проба	Калибровочная проба
Рабочий реагент, раствор пикриновой кислоты с детергентом	1000	1000
Калибратор, раствор креатинина 240 мкмоль/л	-	100
Проба, сыворотка, плазма или разведенная в 25–50 раз моча	100	-

Содержимое проб перемешивают и фотометрируют против дистиллированной воды при длине волны 500 нм.

Концентрация креатинина в норме:		
Сыворотка	дети	27–62 мкмоль/л
	женщины	44–88 мкмоль/л
	мужчины	44–100 мкмоль/л
Моча		4,4–17,6 ммоль/сут

Практическое значение

Увеличение содержания креатинина в крови вызывается острыми и хроническими нарушениями функции почек различного генеза, закупоркой мочевыводящих путей, кишечной непроходимостью, выявляется при заболеваниях печени, голодании, также наблюдается при акромегалии и гипертиреозе.

Гипокреатининемия отмечается при уменьшении мышечной массы, во время беременности (особенно I и II триместры).

Оформление работы

Отмечают принцип методов определения мочевины и креатинина, результаты проведения анализов. Делают вывод о возможных патологиях.

ТЕМА 3.4. ПИГМЕНТНЫЙ ОБМЕН

Актуальность

Пигментный обмен – совокупность сложных превращений окрашенных веществ тканей и биологических жидкостей. Большинство пигментов имеет белковое происхождение и являются дериватами порфириновых структур и ароматических соединений. Нарушение метаболизма этих веществ свидетельствует чаще всего о нарушениях функций печени и желчевыводящей системы.

Цель

Изучить пути обмена гемоглобина и образования пигментов. Научиться определять концентрацию билирубина в сыворотке крови.

Необходимо знать:

1. Строение гема и билирубина.
2. Метаболизм гема в печени. Образование желчных пигментов в печени и кишечнике, их дальнейшую судьбу. Фракции билирубина в сыворотке крови.
3. Строение УДФ-глюкуроновой кислоты, ее функцию.
4. Заболевания, связанные с нарушениями обмена билирубина.

Необходимо уметь:

1. Нарисовать схему метаболизма билирубина в организме.
2. Определять концентрацию билирубина и его фракций в крови.
3. Анализировать полученные результаты.

Вопросы для самоподготовки:

1. Понятия «пигменты», «хромопротеины» и «гемопроотеины», структура и функции гемоглобина, миоглобина, цитохромов, ка-

- талазы, пероксидазы.
2. Биосинтез гема и гемоглобина. Локализация, предшественники и регуляция.
 3. Нарушения синтеза гема. Порфирии.
 4. Распад гемоглобина. Вердоглобин. Биливердин. Билирубин.
 5. Свойства билирубина. Токсичность.
 6. Транспорт билирубина в крови. УДФ-глюкуронилтрансфераза печени.
 7. Метаболизм билирубина в желчных ходах и кишечнике. Желчные пигменты. Пигменты мочи и кала.
 8. Патология обмена билирубина. Гемолитическая, паренхиматозная, обтурационная желтухи. Желтуха новорожденных. Врожденные нарушения обмена билирубина.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Определение концентрации билирубина в сыворотке крови по Йендрашику–Клеггорну–Грофу

В клинике состояние пигментного обмена определяют, оценивая:

1. Количество промежуточных и конечных метаболитов синтеза порфириновых структур (порфобилиногена, δ -аминолевулиновой кислоты, копропорфирина, уропорфирина) и активность δ -аминолевулинатдегидратазы.
2. Уровень желчных пигментов – продуктов распада гемоглобина и других хромопротеинов (общего билирубина и его фракций).

Для определения концентрации общего билирубина и его фракций в сыворотке крови применяют колориметрические диазометоды. Эти методы базируются на взаимодействии билирубина с диазотированной сульфаниловой кислотой с образованием азопигментов (реакция Эрлиха). Под воздействием кислоты разрывается тетрапирроловая структура билирубина с образованием двух дипирролов. Углеродные атомы метиленовых групп вступают в прямую реакцию с диазотированной сульфоновой кислотой (диазосмесь) с образованием розово-фиолетовых изомеров азодипиррола с максимумом поглощения при длине волны 530 нм. Связанный билирубин, ввиду своей гидрофильности, сразу же вступает в реакцию. Несвязанный билирубин, по причине своей гидрофобности (липофильности) – только после добавления акселераторов (кофеина, метанола, мочевины, бензоата или гидроокиси натрия, уксусной кислоты), которые переводят липофильный несвязанный билирубин в водорастворимую форму и, тем самым, ускоряет реакцию азосочетания. Образовавшийся азокраситель ведет себя как кислотно-

основной индикатор с несколькими цветными переходами: в сильно-кислой среде он окрашен в фиолетовый цвет, в слабощелочной и слабокислой – в розовый, в сильнощелочной среде – в синий или зеленый цвета.

Принцип метода

Определение общего и конъюгированного билирубина (**БР**) основано на реакции диазотирования билирубина диазосульфаниловой кислотой в присутствии ускорителя реакции кофеина-бензоата натрия (**общий БР**) и в отсутствии ускорителя (**конъюгированный БР**). В результате реакции образуется соединение розового цвета, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации билирубина.

Ход проведения анализа

Отмерить, мкл	Калибровочная проба	БР общ. опытная проба	БР конъюг. опытная проба	Контроль для БР конъюг.	Контроль для калибратора	Контроль для БР общ.
Реагент 1, раствор кофеина-бензоата и сульфаниловой кислоты	1000	1000	-	-	1000	1000
Реагент 2, раствор натрия азотнокислого	50	50	-	-	-	-
Реагент 3, раствор сульфаниловой кислоты	-	-	1000	1000	-	-
Реагент 4, раствор азотнокислого натрия	-	-	50	-	-	-
Проба, сыворотка крови	100	-	100	100	100	-
Калибратор, раствор билирубина 20–40 мкмоль/л			100	-	-	

Пробы перемешать, выдержать при комнатной температуре: конъюгированный БР 7 мин (точно!); контроль для конъюгированного БР – 7 мин; общий БР, калибровочную и контрольную пробы для калибратора и общего билирубина – 20 мин. Измерить оптическую плотность растворов против дистиллированной воды при длине волны 546 нм.

Расчет

Находят разность между оптической плотностью опытной пробы и контроля, количество БР рассчитывают по калибровочному графику. Фракцию непрямого БР определяют как разность между общим и прямым БР.

Построение калибровочного графика

№ пробы	Раствор билирубина, мл	Раствор альбумина, мл	Концентрация билирубина в пробе, мкмоль/л
1	0,10	1,90	10
2	0,25	1,75	25
3	0,50	1,50	50
4	0,75	1,25	75
5	1,00	1,00	100
Обрабатывают и колориметрируют так же, как опытные пробы.			

Концентрация общего и прямого билирубина в сыворотке крови в норме:

Сыворотка:

Общий билирубин

Дети:	
возраст до 5 дней	< 205,2 мкмоль/л
впоследствии	3,4–17,1 мкмоль/л
Взрослые:	8,5–20,5 мкмоль/л

Прямой билирубин

Взрослые:	2,2–5,1 мкмоль/л
-----------	------------------

Моча: билирубин отсутствует

Практическое значение

- Гемолитическая или 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. К данному типу желтух относится гемолитические анемии различного происхождения, В₁₂-дефицитная анемия, некоторые врожденные формы – сфероцитоз, дефицит глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы.
- 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 увеличения проницаемости мембран клеток печени. В моче определяется билирубин, умеренно увеличена концентрация уробилина, уровень стеркобилина кала в норме или снижен. Наблюдается при гепатитах, циррозе и опухолях печени, жировой дистрофии, при других состояниях организма (см. таблицу).

Печеночно-клеточные желтухи

Тип желтухи	Причина заболевания	Лабораторные показатели
Синдром Жильбера–Мейленграхта	Генетически обусловленное нарушение элиминации билирубина из плазмы крови, понижение активности УДФ-глюкуронил трансферазы	Периодическое повышение содержания свободного билирубина плазмы, связанное с физическим и эмоциональным напряжением
Синдром Дубина–Джонсона	Недостаточность выведения конъюгированного билирубина из гепатоцитов в желчные протоки	Увеличение содержания свободного и конъюгированного билирубина в плазме
Физиологическая желтуха новорожденных	Недостаточная активность УДФ-глюкуронилтрансферазы в первые дни жизни	Увеличение концентрации свободного билирубина в сыворотке до 140–240 мкмоль/л
Желтуха недоношенных	Недостаточная активность УДФ-глюкуронилтрансферазы	Увеличение концентрации свободного билирубина в сыворотке
Транзиторная негемолитическая гипербилирубинемия новорожденных	Подавление активности УДФ-глюкуронилтрансферазы эстрогенами материнского молока	Увеличение концентрации свободного билирубина в сыворотке
Синдром Криглера–Найяра		
Тип I	Полное отсутствие активности УДФ-глюкуронилтрансферазы вследствие генетического дефекта: развитие ядерной желтухи и гибель ребенка.	Непрерывное возрастание содержания свободного билирубина в плазме до 200–800 мкмоль/л. Отсутствие конъюгированного билирубина в желчи.
Тип II	Генетически обусловленное резкое снижение активности УДФ-глюкуронилтрансферазы.	Увеличение концентрации свободного билирубина в сыворотке, в желчи есть билирубинглюкуронид.

3. **Механическая или подпеченочная желтуха** развивается вследствие нарушения оттока желчи при закупорке желчного протока, в результате застоя желчи идет растяжение желчных капилляров, увеличивается их проницаемость. Не имеющий оттока в желчь прямой билирубин поступает в кровь, в результате развивается гипербилирубинемия. В тяжелых случаях, вследствие переполнения гепатоцитов прямым билирубином, конъюгация его с глюкуроновой кислотой может нарушаться, в крови

будет увеличиваться количество несвязанного билирубина. В моче резко увеличен уровень билирубина и снижено количество уробилина, практически отсутствует стеркобилин кала. Кроме указанных причин, подпеченочные желтухи выявляются при новообразованиях поджелудочной железы и гельминтозах.

Закупорка внепеченочных желчных путей является классической причиной билирубинемии. Показатель полезен в дифференциальной диагностике желтух, поскольку билирубинемия характерна для обтурационной и паренхиматозной желтух (повышение уровня связанного билирубина в сыворотке), но отсутствует при гемолитической. При гепатите билирубин может быть обнаружен в моче до появления желтухи.

Оформление работы:

Отмечают принцип метода, результаты проведения анализа. Делают вывод о возможных патологиях.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

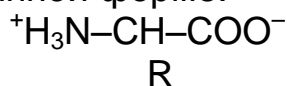
1. Многие белки содержат ковалентно связанные углеводные остатки. Как правило, местом присоединения углеводов к белку являются оксикислоты. Назовите известные Вам оксиаминокислоты и напишите их формулы.

2. Гистоны представляют собой небольшие основные белки, связывающиеся с ДНК в хроматине. Они содержат относительно много положительно заряженных аминокислот, радикалы которых взаимодействуют с отрицательно заряженными остатками фосфорной кислоты в ДНК. Предположите, какие диаминокарбоновые кислоты входят в состав молекул гистонов. Напишите их формулы.

3. При pH 7,0 большинство аминокислот существует в виде цвиттер-ионов (α -аминогруппа протонирована, α -карбоксильная группа депротонирована).

1. Назовите аминокислоты, имеющие при pH 7 дополнительный отрицательный заряд, и напишите их формулы в ионизированной форме.

2. Назовите аминокислоты, имеющие при pH 7 дополнительный положительный заряд, и напишите их формулы в ионизированной форме:



цвиттер-ион

4. Подберите к каждой из аминокислот соответствующее свойство радикала:

Три
Асп
Цис
Лей
Арг
Сер

A. Гидрофильный с анионной группой.
B. Гидрофильный с катионной группой.
C. Гидрофильный незаряженный.
D. Гидрофобный.

5. Напишите структурную формулу пентапептида следующего строения: Цис-Арг-Фен-Глу-Три.

1. Обозначьте С- и N-концы пептида.
2. Отметьте регулярно повторяющиеся группы, образующие пептидный остов и радикалы аминокислот.
3. Какие из изученных Вами цветных реакций будут положительны с данным пептидом?

6. О чем позволяют судить цветные реакции на белки?

1. О наличии белков в биологических жидкостях.
2. О первичной структуре белка.
3. О наличии некоторых аминокислот в белках.
4. О функциях белков.

7. Определите последовательность аминокислот в тетрапептиде, используя следующие данные:

1. При анализе N-концевой аминокислоты и аминокислотного состава пептида получено Цис- (Три, Про, Сер).
2. После гидролиза химотрипсином (расщепляет в основном пептидные связи, в образовании которых участвуют карбоксильные группы ароматических аминокислот) образуется трипептид, содержащий Три, Цис, Про.

8. Определите последовательность аминокислот в тетрапептиде, используя следующие данные:

1. При анализе N-концевой аминокислоты и аминокислотного состава пептида получено Фен- (Лиз, Глу, Про).
2. После гидролиза трипсином (расщепляет в основном пептидные связи, в образовании которых участвуют карбоксильные группы лизина и аргинина) образуется трипептид, содержащий Лиз, Фен, Про.

9. Разные уровни структурной организации белков стабилизированы определенными типами связей; подберите каждому пронумерованному типу связи буквенный ответ.

- | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. Связь между карбоксильными и аминогруппами радикалов аминокислот. 2. Связь между α-амино- и α-карбоксильными группами аминокислот. 3. Связи между радикалами цистеина. 4. Водородные связи между пептидными группировками. 5. Водородные связи между радикалами аминокислот. 6. Гидрофобные взаимодействия радикалов аминокислот. | <ol style="list-style-type: none"> A. Первичная структура. B. Вторичная структура. C. Третичная структура. |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

10. Подберите к каждому уровню структурной организации белка соответствующее понятие.

- | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. Первичная структура. 2. Вторичная структура. 3. Третичная структура. | <ol style="list-style-type: none"> A. Конформация пептидного остова в формировании которой участвуют водородные связи между пептидными группировками. B. Порядок чередования аминокислот в белках. C. Пространственное расположение и характер взаимодействия пептидных цепей в олигомерном белке. D. Конформация полипептидной цепи, стабилизированная межрадикальными связями. |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Следующие вопросы построены как сложноподчиненные предложения, связанное словами «ПОТОМУ, ЧТО». Для выбора ответа сначала нужно оценить правильность («верно» или «не верно») первого главного предложения (т. е. до слов «ПОТОМУ, ЧТО») затем правильность второго (придаточного) предложения и далее – правильность смысловой связи между ними «ПОТОМУ, ЧТО».

11. Процесс сборки протомеров характеризуется высокой специфичностью ПОТОМУ, ЧТО узнавание протомеров происходит благодаря наличию комплементарных поверхностей.

12. Для белков характерна конформационная лабильность ПОТОМУ, ЧТО пространственная структура белка фиксирована преимущественно слабыми взаимодействиями.

13. Активный центр белка представлен радикалами аминокислот, принадлежащим различным участкам полипептидного остова ПОТОМУ, ЧТО активный центр белка образуется в результате формирования третичной структуры.

14. Биологические свойства белков определяются их первичной структурой ПОТОМУ, ЧТО формирование центра узнавания, обеспечивающего специфическое взаимодействие с лигандом, происходит на уровне первичной структуры белка.

15. Чем сопровождается денатурация белков:

1. Нарушением большого числа межрадикальных связей.
2. Уменьшением растворимости.
3. Нарушением пространственной структуры.
4. Изменением первичной структуры.

16. Денатурация белков – сложный процесс изменения нативной конформации молекулы. Что происходит при этом?

1. Изменение нековалентных связей.
2. Потеря способности взаимодействовать с природным лигандом.
3. Уменьшение растворимости белка.
4. Разрыв пептидных связей.

17. Что понимается под денатурацией белка:

1. Уменьшение растворимости белка при добавлении солей щелочных или щелочно-земельных металлов.
2. Потеря биологической активности белка в результате его гидролиза.
3. Изменение конформации белка, сопровождающееся потерей его биологической активности.
4. Конформационные изменения белка в результате взаимодействия с природными лигандами.

18. При определенных условиях возможна ренатурация денатурированного белка ПОТОМУ, ЧТО конформация пептидной цепи определяется его первичной структурой.

19. При употреблении большого количества сырых яиц может развиться (особенно у детей) гиповитаминоз биотина, сопровождаю-

щийся специфическим дерматитом (болезнь Свифта). Обнаружено, что в сырых яйцах содержится гликопротеин авидин. В желудочно-кишечном тракте авидин образует нерастворимый комплекс с биотином. Почему вареные яйца такого эффекта не вызывают?

20. Дан пептид Арг-Лиз-Асп-Сер.

1. Около каждой аминокислоты укажите заряд ее радикала (0, +, -) при pH 7,0; определите область pH (>7,0, <7,0 или 7,0), в которой лежит изоэлектрическая точка данного пептида.
2. Что происходит с пептидом в электрическом поле при pH 7,0: движется к аноду либо к катоду или остается на старте?
3. Как изменится заряд пептида при pH=7,0, если аминокислоту Лиз заменить на Лей? Изменится ли и, если да, то каким образом, направление его движения в электрическом поле?

21. Чем определяется растворимость белков в водной среде?

1. Ионизацией белковой молекулы.
2. Гидратацией белковых молекул при растворении.
3. Формой молекулы белка.
4. Способностью связывать природные лиганды.

22. Высаливание – один из методов фракционирования белков.

А. Выделите свойство белков, которое в наибольшей мере зависит от концентрации солей.

1. Суммарный заряд
2. Степень гидратации белков
3. Размер белковых молекул
4. Форма белковых молекул

Б. Почему при изменении этого параметра растворимость белка падает?

В. Почему при ступенчатом повышении концентрации сульфата аммония (например, от 30% до 50%) на каждой ступени из экстракта ткани выпадают в осадок не все белки, а лишь некоторые?

23. На каком различии основано фракционирование белков методом гель-фильтрации?

1. По растворимости.
2. По форме молекул
3. По суммарному заряду.
4. По молекулярной массе.

24. Что происходит с белками при высаливании и денатурации?

- | | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ol style="list-style-type: none">1. Уменьшение растворимости.2. Изменение степени гидратации.3. Обратимое осаждение белка.4. Необратимое осаждение белка.5. Сохранение нативной структуры.6. Изменение молекулярной массы.7. Необратимое изменение биологических свойств. | <ol style="list-style-type: none">A. Характерно только для высаливания.B. Характерно только для денатурации.C. Характерно для обоих процессов.D. Не характерно ни для одного из указанных процессов. |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

25. На различиях каких физико-химических свойств белков основаны методы разделения и выделения индивидуальных белков?

- | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ol style="list-style-type: none">1. Ультрацентрифугирование.2. Электрофорез.3. Гель-фильтрация.4. Ионообменная хроматография.5. Солевое фракционирование. | <ol style="list-style-type: none">A. Ионизация.B. Гидратация.C. Молекулярная масса. |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

26. Известно, что конформация белковой молекулы может меняться при воздействии различных факторов. Выберите варианты соответствия ответов из правой части таблицы на вопросы А и Б.

Какие из перечисленных факторов могут:

A. Регулировать биологическую активность белков в организме человека;

Б. Вызывать денатурацию белка.

1. Изменение температуры.
2. Взаимодействие с лигандами (субстратами, эффекторами-регуляторами, кофакторами).
3. Отщепление части пептидной цепи при действии протеолитических ферментов.
4. Изменение рН.
5. Изменение химической модификации белков (присоединение фосфатной метильной или ацетильной группы к молекуле белка).
6. Действие солей тяжелых металлов.

27. Поскольку аминокислоты служат строительными блоками белков, знание их структуры и химических свойств имеет первостепенное значение для понимания того, как белки выполняют свои биологические функции. Вспомните строение радикалов следующих 16 аминокислот: Ала, Арг, Асн, Асп, Цис, Глу, Гли, Гис, Лиз, Мет,

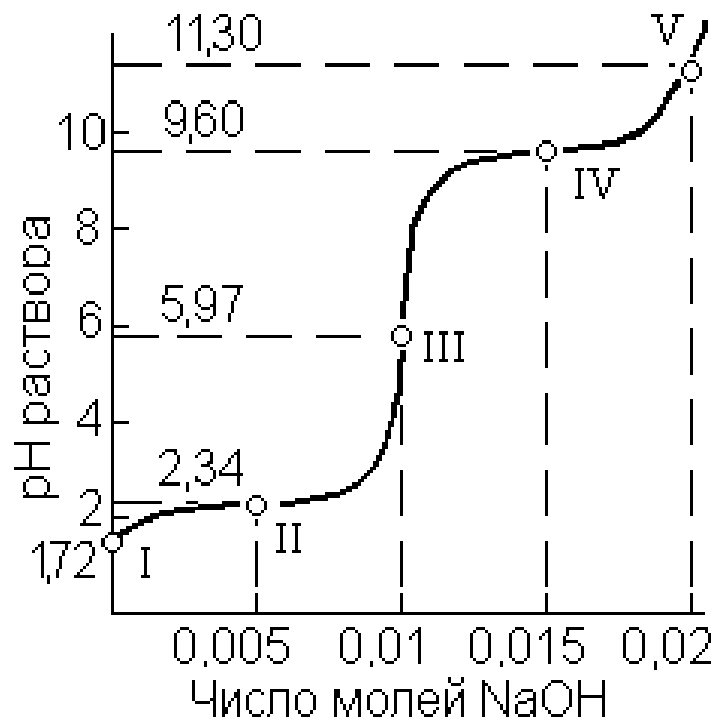
Фен, Про, Сер, Три, Тир, Вал. Какие из перечисленных ниже свойств характерны для каждой из этих аминокислот? Некоторые из этих свойств можно использовать для характеристики более чем одной аминокислоты.

1. Небольшая полярная R-группа, содержащая гидроксильную группу. Соответствующая аминокислота играет важную роль в функционировании активных центров некоторых ферментов.
2. R-группа создает наименьшие стерические ограничения.
3. R-группа имеет $pK' \approx 10,5$ и при физиологических значениях pH несет положительный заряд.
4. Серосодержащая R-группа, нейтральна при всех значениях pH.
5. Ароматическая R-группа, имеет гидрофобную природу и нейтральна при всех значениях pH.
6. R-группа, представляющая собой остаток насыщенного углеводорода, вносит важный вклад в гидрофобные взаимодействия.
7. Единственная аминокислота, содержащая ионизируемую R-группу с величиной pK' , близкой к 7. Играет важную роль в функционировании активных центров ряда ферментов.
8. Единственная аминокислота, содержащая замещенную α -аминогруппу. Влияет на процесс свертывания белковой цепи, так как служит местом вынужденного изгиба цепи.
9. R-группа имеет величину pK' около 4 и при pH 7 несет отрицательный заряд.
10. Ароматическая R-группа, способная участвовать в образовании водородных связей; имеет величину pK' , близкую к 10.
11. Образует дисульфидные поперечные связи между полипептидными цепями, величина pK' функциональной группы близка к 8.
12. R-группа с величиной $pK' \approx 12$, несет положительный заряд при всех физиологических значениях pH. В некоторых белках играет важную роль в связывании отрицательно заряженных фосфатных групп.
13. Если эту полярную, но незаряженную R-группу подвергнуть гидролизу, то содержащая ее аминокислота превращается в другую аминокислоту с отрицательно заряженной R-группой при pH около 7.

28. 0,1 М раствор глицина (100 мл), имеющий pH 1,72, был оттитрован 2М раствором NaOH. В ходе титрования производилась регистрация pH, полученные данные были отложены на графике, представленном на рисунке. Наиболее важные точки на графике

обозначены римскими цифрами от I до V. Какую из этих точек на кривой титрования следует указать, отвечая на поставленные ниже вопросы? Поясните свой выбор.

1. Какая точка соответствует рН, при котором в 0,1 М растворе глицина эта аминокислота существует в форме ионов $^+\text{NH}_3\text{-CH}_2\text{-COOH}$?
2. В какой точке средний суммарный заряд молекулы глицина равен $+1/2$?
3. В какой точке аминокислотные группы ионизированы у половины молекул глицина?
4. В какой точке значение рН равно величине рК' ионизации карбоксильной группы глицина?
5. В какой точке значение рН равно величине рК' ионизации протонированной аминокислотной группы ($^+\text{NH}_3$) глицина?
6. В какой точке глицин обладает максимальной буферной емкостью?
7. В какой точке средний суммарный заряд глицина равен нулю?
8. В какой точке карбоксильная группа глицина оказывается полностью оттитрованной (первая точка эквивалентности)?
9. В какой точке ионизирована половина карбоксильных групп?
10. В какой точке глицин полностью оттитрован (вторая точка эквивалентности)?
11. В какой точке глицин преимущественно существует в форме ионов $^+\text{NH}_3\text{-CH}_2\text{-COO}^-$?
12. В какой точке молекулы глицина превращаются на 50% в ионы $^+\text{NH}_3\text{-CH}_2\text{-COO}^-$ и на 50% в ионы $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}^-$?
13. В какой точке средний суммарный заряд молекулы глицина равен -1 ?
14. В какой точке 50% молекул глицин превращаются в ионы $^+\text{NH}_3\text{-CH}_2\text{-COOH}$, а остальные 50% – в ионы $^+\text{NH}_3\text{-CH}_2\text{-COO}^-$?
15. Какой точке соответствует изоэлектрическая точка глицина?
16. В какой точке средний суммарный заряд глицина равен $-1/2$?
17. Какой точке соответствует конец титрования?
18. Для того, чтобы использовать глицин в качестве эффективного буфера, необходимо знать, при каких значениях рН раствор глицина обладает минимальной буферной емкостью. Укажите на кривой титрования глицина соответствующие точки.
19. В какой точке в ходе титрования преобладающей формой глицина становятся ионы $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}^-$?



29. Раствор глицина часто применяют в качестве буфера. Для приготовления 0,1 М глицинового буфера используют 0,1М растворы солянокислого глицина ($^+\text{NH}_3\text{-CH}_2\text{-COOH}\cdot\text{Cl}^-$) и глицина ($^+\text{NH}_3\text{-CH}_2\text{-COO}^-$) – две формы глицина, имеющиеся в продаже. Какие объемы этих двух растворов следует смешать, чтобы приготовить 1 л 0,1М глицинового буфера, имеющего pH 3,2?

30. Анализ смеси аминокислот начинают с разделения этой смеси на компоненты методом ионообменной хроматографии. Небольшое количество смеси вносят в верхнюю часть колонки, заполненной частицами полистирола, содержащими остатки сульфоновой кислоты. Затем через колонку пропускают буферный раствор. Аминокислоты проходят через колонку с разными скоростями, поскольку их движение тормозят два фактора: 1) электростатическое притяжение между отрицательно заряженными функциональными группами аминокислот и 2) гидрофобное взаимодействие между боковыми цепями аминокислот и сильно гидрофобным остовом полистирольной смолы. Для каждой из описанных пар аминокислот определите, какая аминокислота данной пары будет сходить с колонки первой (т.е. испытывать наименьшее торможение) при пропускании через колонку буфера с pH 7,0.

а) Асп и Лиз, б) Арг и Мет, в) Глу и Вал, г) Гли и Лей, д) Сер и Ала

31. По данным количественного аминокислотного анализа в сывороточном альбумине быка содержится 0,58% (по весу) триптофана, ММ которого равна 204.

1. Рассчитайте минимальную молекулярную массу сывороточного альбумина быка.

2. По данным гель-фильтрации молекулярная масса сывороточного альбумина быка составляет приблизительно 70000. Сколько остатков триптофана присутствует в молекуле сывороточного альбумина?

32. Содержание лизина в рибонуклеазе составляет 10,5% (по весу). Число молекул лизина в ферменте равно 10. Рассчитайте молекулярную массу рибонуклеазы.

33. Изоэлектрическая точка гистонов очень высока (около 10,8). Какие аминокислотные остатки должны присутствовать в гистонах в относительно больших количествах? Каким образом эти остатки обеспечивают прочное связывание гистонов с ДНК?

34. Из нормальной мозговой ткани была выделена группа полипептидов, влияющих на передачу нервного импульса в определенных участках мозга. Эти полипептиды известны под названиями *опиоидов*, поскольку они присоединяются к специфическим рецепторам, которые связывают опиаты (алкалоиды опиума), такие как морфин и налоксон. Таким образом, опиоиды имитируют некоторые свойства опиатов. Некоторые исследователи рассматривают эти полипептиды как содержащиеся в мозгу собственные средства обезболивания. Используя приведенные сведения, определите аминокислотную последовательность опиоида лей-энкефалина:

1. Полный гидролиз под действием 1 М HCl при 110°C с последующим аминокислотным анализом выявил присутствие Гли, Лей, Фен, Тир в молярном отношении 2:1:1:1.
2. После обработки полипептида 2,4-динитрофторбензолом с последующим полным гидролизом и хроматографическим разделением продуктов было выявлено присутствие 2,4-динитрофторбензольного производного тирозина при этом не было обнаружено.
3. Частичный гидролиз полипептида химотрипсином с последующим хроматографическим разделением полученных продуктов дал Лей, Тир и более короткий пептид. Полный гидролиз последнего с последующим аминокислотным анализом выявил присутствие Гли и Фен в отношении 2:1.

35. Некоторое количество (660 мг) олигомерного белка с молекулярной массой 132000 обрабатывали избытком 2,4-динитрофторбензола в слабощелочной среде вплоть до завершения химической реакции. Затем пептидные связи белка были подвергнуты гидролизу путем нагревания белка в присутствии концентрированной HCl. В гидролизате содержалось 5,5 мг 1-лейцил-2,4-динитробензола. Ни-

каких других 2,4-динитрофенильных производных, образующихся в реакции с α -аминогруппами аминокислот, обнаружено не было.

1. Объясните, почему эти данные можно использовать для определения числа полипептидных цепей в олигомерном белке.
2. Рассчитайте число полипептидных цепей в этом белке.

36. Почему при электрофорезе в ПААГ раствора гемоглобина в 8,0 мМ мочевины на фореграмме получаются две полосы?

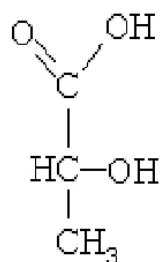
37. Будут ли у Вас обнаруживаться признаки недостаточности аспартата на рационе, который богат аланином, но беден аспаратом? Дайте аргументированный ответ.

38. В больницу доставлен двухлетний ребенок. По словам матери, он страдает частой рвотой. Рвоты случаются главным образом после приема пищи. Ребенок отстает в весе и физическом развитии. Волосы темные, но попадаются седые пряди. Проба мочи после добавления FeCl_3 приобрела зеленый цвет, что указывает на присутствие в моче фенилпировиноградной кислоты. Количественный анализ мочи дал следующие результаты:

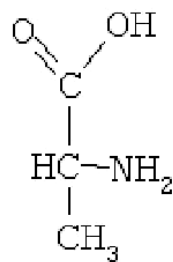
Вещество	Содержание в моче, ммоль/л	
	У больного	В норме
Фенилаланин	7,0	0,01
Фенилпируват	4,8	0
Фениллактат	10,3	0

1. Какой фермент, по-видимому, неактивен?
2. Почему в моче в больших количествах появляется фенилаланин?
3. Что служит источником фенилпирувата и фениллактата? Почему этот путь (отсутствующий у здоровых людей) начинает функционировать, когда концентрация лактата повышается?
4. Почему в волосах больного имеются седые пряди?

39. По степени окисления трех атомов углерода, входящих в молекулы лактата и аланина, эти соединения идентичны; в животном организме оба этих источника углерода могут служить метаболическим топливом. Сравните суммарные выходы АТФ (число молей АТФ, образовавшихся на 1 моль субстрата) при полном окислении до CO_2 и H_2O лактата и аланина, учтя при этом расход АТФ на выведение азота в форме мочевины.



Лактат



Аланин

40. Опубликовано сообщение о следующем эксперименте. Кошкам, не получившим пищи накануне вечером, дали утром натощак аминокислотную смесь, содержащую весь набор аминокислот, за исключением аргинина. Через 2 часа содержание аммиака в крови у животных возросло до 140 мкг/мл (при норме 18 мкг/мл) и появились клинические симптомы аммиачного отравления. Одна из кошек, съевшая всего лишь 8 г такой аминокислотной смеси, через 4,5 ч погибла. В контрольной группе, получившей полный набор аминокислот или смесь, в которой аргинин был заменен орнитином, никаких необычных клинических симптомов обнаружено не было.

1. Какую роль играло в этом эксперименте предварительное голодание?
2. В чем причина повышения уровня аммиака в крови? Почему отсутствие аргинина в рационе приводит к аммиачному отравлению? Является ли для кошек аргинин незаменимой аминокислотой?
3. Почему аргинин может быть заменен орнитином?

РАЗДЕЛ 4

ФЕРМЕНТЫ. КЛАССИФИКАЦИЯ, СТРУКТУРА И СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ

Актуальность

Обмен веществ в живом организме – каскад ферментативных реакций. Знание строения и свойств ферментов, механизмов биокатализа и кинетики реакций, катализируемых ферментами, необходимы для понимания особенностей метаболизма. Без изучения механизмов регуляции активности ферментов невозможна разработка лекарственной терапии и понимание патогенеза энзимопатий. Определение активности ферментов и их молекулярных форм в тканях, субклеточных фракциях, биологических жидкостях имеет большое теоретическое (поиск путей регуляции, проведение ингибиторного анализа) и клинико-диагностическое значение для исследования состояния паренхимы печени, диагностики заболеваний сердца, поджелудочной железы и т. п.

В современной биохимии ферменты используются как самые специфичные и чувствительные реагенты для определения концентрации большинства метаболитов.

Цель

1. Изучить структуру, свойства и классификацию ферментов.
2. Знать особенности работы с ферментами.
3. Практически освоить навыки определения активности ферментов.

Необходимо знать:

1. Классификацию ферментов, их кофакторы и строение.
2. Единицы измерения активности ферментов.
3. Кинетику ферментативных реакций.
4. Способы определения активности ферментов, условия постановки реакции *in vitro* (рН, температура, кофакторы, активаторы и ингибиторы, соотношение концентрации субстрата и фермента).
5. Механизмы регуляции активности ферментов.

Необходимо уметь:

1. Исследовать свойства ферментов.
2. Определять активность ферментов.
3. Выводить уравнение и определять значение константы Миха-

элиса–Ментен, начальную и максимальную скорость реакции. Строить графики зависимости скорости реакции от концентрации субстрата в прямых и обратных координатах.

4. Определять класс фермента по катализируемой реакции.

Вопросы для самоподготовки:

1. Понятие «ферменты», «простые ферменты», «сложные ферменты».
2. Сходство и отличие ферментов от неорганических катализаторов.
3. Специфичность действия ферментов (абсолютная, относительная, групповая).
4. Механизмы катализа: принципы теории «ключ-замок», «дыбы», «индуцированной подгонки», «пинг-понга», кислотно-основной и ковалентный катализ.
5. Изоферменты и множественные формы ферментов.
6. Кинетика ферментативных реакций. Вывод уравнений Михаэлиса–Ментен и Лайнуивера–Берка. Смысл K_m . Ингибиторный анализ.
7. Факторы, влияющие на активность ферментов *in vitro* (t° , pH, [S]).
8. Регуляция ферментативной активности *in vivo*: изменение количества фермента в клетке, ковалентная модификация ферментов, аллостерическая регуляция, влияние активаторов и ингибиторов, мультиферментные комплексы, внутриклеточная компартментализация.
9. Зависимость активности фермента от концентрации субстрата и продукта реакции, pH, температуры и других условий среды.

Задание: Составить таблицу «Классификация ферментов»

ТЕМА 4.1. СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ

Актуальность

Для работы с ферментами необходимо хорошо представлять себе сходство ферментов с неорганическими катализаторами и особенности их как белковых структур (специфичность, высокую каталитическую активность, зависимость от условий среды и т. д.).

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Исследование общих свойств амилазы

Зависимость ферментативных реакций от различных условий удобно проследить на примере амилазы (α -1,4-глюкан-4-глюкан-

гидролаза, КФ 3.2.1.1.), субстратом для которой служит крахмал, а источником фермента – слюна. Эффективность расщепления крахмала определяют по реакции Троммера и по реакции с реактивом Люголя. Первая позволяет отследить исчезновение субстрата, вторая – образование конечного продукта реакции, а значит скорость реакции.

Реактивы

1. раствор Люголя,
2. 1% и 5% растворы CuSO_4 ,
3. 0,5% и 1,0% растворы крахмала,
4. 5% раствор NaOH ,
5. 0,2М раствор Na_2HPO_4 ,
6. 0,1М раствор лимонной кислоты,
7. 0,9% NaCl ,
8. 1,0% раствор сахарозы.

Качественная реакция на крахмал с реактивом Люголя

Принцип

Продукты гидролиза крахмала амило-, эритро-, ахро- и мальтодекстрины, дают с йодом соответственно фиолетово-синее, бурокрасное и желтое окрашивание. По исчезновению синей окраски и по появлению промежуточных продуктов можно следить за ходом реакции.

По результатам окраски можно оценивать глубину гидролиза крахмала до декстринов разной длины или до мальтозы, которая не окрашивается реактивом Люголя.

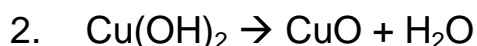
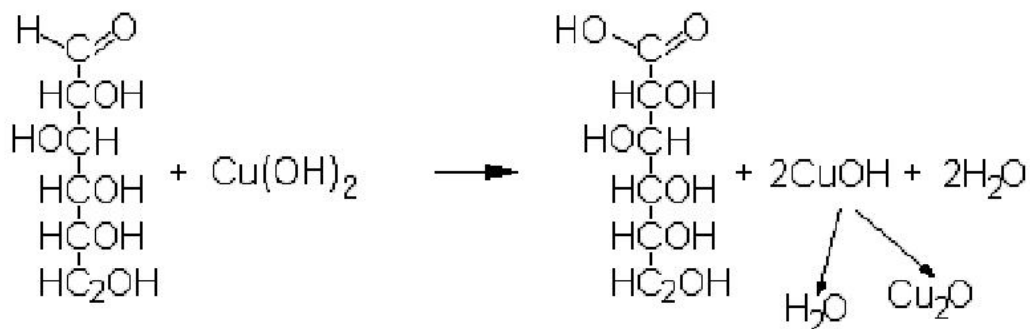
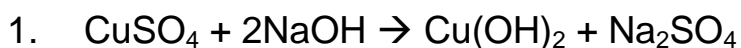
Проведение реакции

К исследуемому раствору, содержащему крахмал или продукты его гидролиза, добавляют 1–2 капли раствора Люголя и наблюдают появление соответствующей окраски.

Качественная реакция на глюкозу (реакция Троммера)

Принцип

Глюкоза, обладающая восстанавливающими свойствами, в щелочной среде восстанавливает гидроксид меди (II) голубого цвета до гидроксида меди (I) желтого цвета. Последний превращается в кирпично-красный Cu_2O . Избыток CuSO_4 может привести к появлению черного осадка окиси меди CuO . Такими же свойствами обладает и дисахарид мальтоза.



Проведение реакции

К исследуемому раствору, содержащему продукты расщепления крахмала, добавляют 1–2 мл 5% NaOH и по каплям, до синеголубого цвета 5% CuSO_4 . Нагреть над спиртовкой 1 мин. Наблюдать за изменением окраски раствора из голубого в кирпично-оранжевый, если в растворе содержится редуцирующий сахар.

Исследуемый материал

Слюна, разведенная в соотношении 1:10 и 1:40.

Исследование эффективности ферментативного и спонтанного гидролиза крахмала

Проведение анализа

	Проба 1, мл	Проба 2, мл
1% раствор крахмала	2,0	2,0
Слюна, 1:10	1,0	-
Дистилл. вода	-	1,0
	Инкубируют в течение 10 мин при +37°C. Проверяют степень гидролиза крахмала по реакции с раствором Люголя и делают вывод.	

Исследование влияния температуры

Проведение анализа

	Проба 1, мл	Проба 2, мл	Проба 3, мл
Слюна, 1:10	1,0	1,0	1,0
	Выдержать при 100°C в течение 10 мин	Выдержать при 0°C в течение 10 мин	Выдержать при 37°C в течение 10 мин
1% раствор крахмала	1,0	1,0	1,0
	Инкубируют в течение 10 мин при 37 °C. Проверяют степень гидролиза крахмала по реакции с раствором Люголя и сделать вывод.		

Исследование влияния pH

Проведение анализа

Для создания сред с различной pH в пробирки добавляют растворы реактивов в соответствии с таблицей:

№ пробы	0,2M Na ₂ HPO ₄	Лимонная кислота	pH
1	0,63	0,37	6,0
2	0,69	0,31	6,4
3	0,77	0,23	6,8
4	0,87	0,13	7,2
5	0,94	0,06	7,6

После создания буферной среды в каждую пробирку добавляют:

	Проба 1, мл	Проба 2, мл	Проба 3, мл	Проба 4, мл	Проба 5, мл
Слюна, 1:10	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
0,9% NaCl	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
0,5% раствор крахмала	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	Инкубируют в течение 10 мин при 37°C. Проверяют степень гидролиза крахмала при разной pH по реакции с раствором Люголя и сделать вывод.				

Исследование субстратной специфичности

Проведение анализа

	Проба 1, мл	Проба 2, мл
1% раствор крахмала	1,0	-
1% раствор сахарозы	-	1,0
Слюна, 1:10	1,0	1,0
	Инкубируют в течение 10 мин при 37°C. Проверяют степень гидролиза крахмала реакцией Троммера и сделать вывод.	

Исследование влияния активатора и ингибитора

Проведение анализа

	Проба 1, мл	Проба 2, мл	Проба 3, мл
Слюна, 1:40	1,0	1,0	1,0
Дистилл. вода	2 капли	-	-
0,9% NaCl	-	2 капли	-
1% CuSO ₄	-	-	2 капли
1% раствор крахмала	1,0	1,0	1,0
	Инкубируют в течение 10 мин при 37°C. Проверяют степень гидролиза крахмала по реакции с раствором Люголя и сделать вывод.		

Оформление работы

Делают вывод о механизмах влияния на активность фермента различных факторов среды.

ТЕМА 4.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ. ЕДИНИЦЫ ИЗМЕРЕНИЯ

Активность ферментов определяют, создавая наиболее оптимальные условия для ферментативной реакции (температура, pH среды, осмотическое давление, наличие кофакторов, активаторов, оптимальное соотношение концентрации фермента и субстрата).

Активность ферментов и их молекулярных форм можно исследовать в биологических жидкостях (сыворотке крови, моче и т. п.), гомогенате тканей, субклеточных фракциях клеток. Активность ферментов определяется по количеству расходуемого субстрата или образующегося продукта или по изменению в ходе реакции физико-химических свойств кофактора за единицу времени (общая активность), и рассчитывается в моль/с·л, мкмоль/с·л, мкмоль/ч·мл, 1 моль/с (1 катал), в мг/ч·мл, в мккат/л, в мкмоль/мин (1 Е или 1 U, 1 unit – стандартная единица фермента), 1 мкмоль/мин·л (1 Е/л, 1 МЕ – международная единица).

Удельную активность фермента относят к постоянной величине (1 литру, если определяют в жидкости относительно постоянного состава) или к количеству общего белка в пробе (к 1 мг белка), как постоянному структурному компоненту ткани.

Число молекул субстрата, подвергающихся превращению одной молекулой фермента в минуту, принято называть числом оборотов фермента (или *молекулярной активностью*).

Можно определять скорость реакции «**по конечной точке**», инкубируя фермент-субстратную смесь в течение определенного времени и останавливая реакцию или **кинетически**, ставя реакцию непосредственно в кювете спектрофотометра и фиксировать изменение концентрации реагирующих веществ в течение нескольких минут.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Определение активности α -амилазы амилокластическим методом

α -Амилаза (диастаза, 1,4- α -D-глюкангидролаза, КФ 3.2.1.1.) катализирует гидролиз α -1,4-глюкозидных связей крахмала, гликогена и родственных им полисахаридов до декстринов разной длины и в конечном итоге до мальтозы. Молекулярная масса фермента около

48000 Д. В состав молекулы входит атом кальция, который не только активирует фермент, но и защищает его от действия протеиназ, активность амилазы возрастает при влиянии ионов хлора. В крови она представлена двумя изоферментами: панкреатическим – Р-тип и слюнным – S-тип. Высокая активность амилазы наблюдается в околоушной и поджелудочной железах. Вместе с тем, ее активность, хотя и намного ниже, обнаруживается в толстом и тонком кишечнике, скелетных мышцах, печени, почках, легких, фаллопиевых трубах, жировой ткани. В крови фермент связан как с белками плазмы крови, так и с форменными элементами.

Принцип

Метод основан на измерении концентрации крахмала до и после его ферментативного гидролиза амилазой по интенсивности окраски реактивом Люголя.

Реактивы

1. 1н раствор йода,
2. 1н раствор HCl,
3. 2,0% субстратный раствор крахмала,
4. 0,1М фосфатный буфер,
5. 0,9% раствор NaCl.

Исследуемый материал: Слюна (развести в 5–10 раз).

Проведение анализа

	ОПЫТ, мл	КОНТРОЛЬ, мл
Раствор крахмала	0,5	0,5
Фосфатный буфер	0,3	0,3
Раствор NaCl	0,1	0,1
Слюна	0,1	-
Инкубируют 10 мин при +37°C		
Соляная кислота	0,1	0,1
Слюна	-	0,1

Из каждой пробирки в колбу на 50 мл переносят 0,2 мл ферментативно-субстратной смеси:

Соляная кислота	0,5	0,5
Раствор йода	0,1	0,1
	Доводят объем до 50 мл водой. Колориметрируют опытную пробу против дистиллированной воды, при длине волны 640 нм в кювете 10 мм.	

Расчет

Рассчитывают количество (г) внесенного в пробу субстрата и производят расчет активности амилазы слюны (г крахмала/мин·л).

Современный способ определения активности амилазы предполагает использование искусственного окрашенного полимерного субстрата по стандартному набору реагентов.

Практическое значение:

Повышение активности фермента происходит, главным образом, при заболеваниях поджелудочной железы. Гиперамилаземия наступает в начале заболевания, достигает максимума к 12–24 ч, затем снижается и приходит к норме на 2–6 день. Возрастание активности фермента также выявляется при беременности, почечной недостаточности, кишечной непроходимости, заболеваниях желчных путей, диабетическом кетоацидозе, некоторых опухолях легких и яичников, поражении слюнных желез.

ТЕМА 4.3. КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Актуальность: Для энзимологической практики большое практическое и теоретическое значение имеет корректное измерение скорости реакции и такой важной индивидуальной характеристики фермента как константа Михаэлиса (K_M). Кинетические исследования, ингибиторный анализ, в частности имеет большое значение для изучения механизмов реакции и структуры ферментов.

K_M (сродство к субстрату) не зависит от содержания фермента в пробе и позволяет правильно оценить насыщающую концентрацию субстрата.

V_{max} зависит от количества фермента в пробе и отражает число оборотов фермента.

На примере предлагаемых задач (Д. Керридж, К. Типтон «Биохимическая логика», 1976) необходимо научиться рассчитывать основные параметры реакций (концентрацию субстрата в пробах, среднюю скорость реакции), графически представлять кинетические параметры в прямых и обратных координатах и определять V_{max} , K_M и тип ингибирования.

Задача 1.

Кинетика лактатдегидрогеназной реакции

Водно-солевые экстракты двух органов (печени и сердца), взятых у одного животного, окисляли L-лактат с восстановлением НАД⁺. Измеряли скорость реакции кинетически по изменению оптической плотности при длине волны 340 нм.

Постановка реакции:

В кюветы спектрофотометра толщиной 1 см добавляли по 0,5 мл экстракта тканей, 0,3 мл 10 мМ раствора НАД⁺, 0,2 мл 30 мМ раствора семикарбазида и 1,0 мл натрий-фосфатного буфера (рН 7,6). Затем в каждую кювету добавляли 100 мМ раствор лактата в разных объемах (см. таблицу на стр. 97) и дистиллированной водой доводили объем каждой пробы до 3,0 мл. Каждые 30 сек измеряли оптическую плотность (см. таблицу «Активность лактатдегидрогеназы из печени и из сердца»).

Семикарбазид связывает образующийся пируват и реакция становится необратимой.

В отличие от окисленной формы НАД⁺, восстановленный НАДН поглощает световой поток при длине волны 340 нм. Молярный коэффициент экстинкции (1,0 молярный раствор НАДН в кювете толщиной 1,0 см) равен $6,220 \times 10^3$.

Задание:

Рассчитайте среднюю скорость реакции в каждой пробе и концентрацию лактата в пробах. Начертите график линейной зависимости (по Лайнуиверу-Берку) скорости реакции (мкмоль НАДН / мин в 3мл среды) от концентрации субстрата (ммоль/ л). Определите Км для ЛДГ в печени и сердце. Определите, где сродство фермента к лактату выше.

Активность лактатдегидрогеназы из печени и из сердца

Время после первого измерения, мин	Оптическая плотность при длине волны 340 нм							
	Объем добавленного L-лактата, мл на 100 мМ раствора							
	0,2	0,25	0,5	1,0	0,2	0,25	0,5	1,0
	Экстракт печени				Экстракт сердца			
0	0,016	0,012	0,023	0,031	0,013	0,030	0,023	0,015
0,5	0,050	0,052	0,080	0,105	0,052	0,074	0,082	0,084
1	0,084	0,092	0,137	0,174	0,090	0,119	0,137	0,155
1,5	0,117	0,131	0,208	0,252	0,127	0,162	0,196	0,222
2	0,149	0,169	0,249	0,328	0,163	0,204	0,258	0,290
2,5	0,180	0,207	0,305	0,397	0,199	0,245	0,315	0,350

Задача 2.

Влияние оксамата натрия на активность лактатдегидрогеназы

Постановка реакции:

2 мл трис-буфера (рН 8,0) и 0,2 мл НАДН вносили в десять кювет спектрофотометра, толщиной 1 см. В пять кювет вносили по 0,1 мл 15 мМ раствора оксамовой кислоты. Во все кюветы добавляли различные объемы 6 мМ раствора пирувата натрия. Конечный

объем довели до 2,9 мл и запускали реакцию внесением 0,1 мл раствора лактатдегидрогеназы, выделенной из *Lactobacillus platarum*.

Задание:

Рассчитайте концентрацию субстратов в пробах и среднюю скорость реакции в отсутствии и присутствии оксамата. Постройте график в двойных обратных координатах и определить V_{max} , K_m и влияние оксамата на активность лактатдегидрогеназной реакции.

*Влияние оксамата на восстановление пирувата
лактатдегидрогеназой*

Время, мин	Оптическая плотность, измеренная при длине волны 340 нм									
	Объём пирувата, мл									
	Без оксамата					С оксаматом				
	0,02	0,03	0,05	0,1	0,2	0,02	0,03	0,05	0,1	0,2
1	0,800	0,804	0,776	0,772	0,726	0,788	0,803	0,803	0,780	0,760
2	0,776	0,768	0,721	0,633	0,583	0,776	0,784	0,776	0,729	0,683
3	0,750	0,727	0,668	0,544	0,460	0,764	0,765	0,748	0,681	0,608
4	0,724	0,692	0,617	0,460	0,350	0,751	0,745	0,721	0,627	0,532

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Какие положения правильно характеризуют активный центр ферментов:

- а) участок, непосредственно взаимодействующий с субстратом и участвующий в катализе;
- б) между активным центром и субстратом имеется комплементарность;
- в) активный центр составляет относительно небольшую часть молекулы фермента;
- г) в активный центр входят только полярные аминокислоты.

2. Что обеспечивает конформационная лабильность структуры ферментов:

- а) превращение субстрата в области активного центра;
- б) специфичность связывания субстрата в активном центре;
- в) выход продуктов из области активного центра;
- г) кооперативное взаимодействие субъединиц в олигомерном белке.

3. Какие из приведенных утверждений характеризуют апофермент:

- а) представляет собой комплекс белка и кофактора;
- б) обладает высокой каталитической активностью;

- в) представляет собой неорганический ион или органическое соединение, являющееся производным витамина;
- г) обладает низкой активностью, часто вообще неактивен.

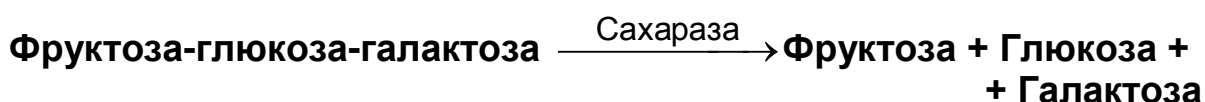
4. Укажите возможные функции металлов в ферментативном катализе, которые

- а) участвуют в связывании фермента с субстратом;
- б) способствуют образованию комплементарной субстрату конформации активного центра;
- в) участвуют в связывании кофермента с ферментом;
- г) стабилизируют четвертичную структуру фермента.

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

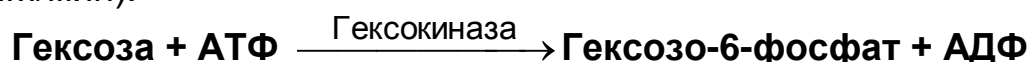
- а) растворение сухого препарата дистиллированной водой комнатной температуры;
- б) при растворении препарата перемешивать осторожно, не допуская образования пены;
- в) хранение раствора препарата при низкой температуре;
- г) при необходимости длительного хранения высушивание препарата и запаивание в вакуумированные ампулы.

6. Фермент сахараза может катализировать расщепление сахарозы и рафинозы:



Если субстратом является сахароза, то $K_m=0,05$ мМ, если рафиноза, то $K_m=2,0$ мМ. В каком случае при одинаковой концентрации субстратов скорость реакции будет больше?

7. Изобразите в виде графиков зависимость скорости реакции, катализируемой гексокиназой, от концентрации субстратов глюкозы ($K_m=0,04$ мМ) и фруктозы ($K_m=1,5$ мМ), если считать $V_{\text{макс}}$ одинаковой (10 мМ/мин).



В каком случае при одинаковой концентрации субстрата (например, 0,1 мМ) скорость реакции будет выше?

8. Укажите класс ферментов, катализирующих следующие реакции:

- а) Ала + тРНК + АТФ → Ала~тРНК + АМФ + ФФ;
- б) Ацетил~S-CoA + CO₂ + АТФ → Малонил~S-CoA + АДФ + Н₃РO₄;
- в) 1,3-дифосфоглицерат + АДФ → 3-фосфоглицерат + АТФ;
- г) Фен + НАДФН + Н⁺ + O₂ ↔ Тир + НАДФ + Н₂O;
- д) Фосфодиоксиацетон → Фосфоглицериновый альдегид;
- е) Триацилглицерол + Н₂O → Глицерин + Жирная кислота;
- ж) Фруктозо-1,6-дифосфат ↔ Диоксиацетонфосфат + глицеральдегидфосфат;
- з) (Гликоген)_n + Н₃РO₄ → Глюкозо-1-фосфат + (Гликоген)_{n-1}

9. Подберите способ регуляции активности для каждого из перечисленных ферментов:

- а) Протеинкиназа неактивная $\xrightarrow{\text{цАМФ}}$ Протеинкиназа активная;
- б) Гликогенсинтетаза неактивная → Н₃РO₄ + Гликогенсинтетаза активная;
- в) Аденилатциклаза неактивная $\xrightarrow{\text{Адреналин}}$ Аденилатциклаза активная;
- г) Пепсиноген $\xrightarrow{\text{H}_2\text{O}}$ Пепсин + Пептид;
- д) Фосфорилаза (неакт) $\xrightarrow{\text{АТФ}}$ Фосфорилаза (акт) + АДФ;
- е) аллостерическая регуляция;
- ж) регуляция путем фосфорилирования или дефосфорилирования;
- з) регуляция путем ассоциации и диссоциации субъединиц;
- и) частичный протеолиз.

10. Активность ферментов в присутствии ингибиторов может быть снижена. Укажите причину этого, выбрав один наиболее правильный и полный ответ.

- а) взаимодействие ингибитора с функциональными группами аминокислот активного центра;
- б) взаимодействие ингибитора с функциональными группами аминокислот вне активного центра;
- в) конформационные изменения молекул фермента.
- г) уменьшение количества фермент-субстратного комплекса.
- д) взаимодействие ингибитора с функциональными группами аллостерического центра.

11. Выберите основные особенности строения и функционирования аллостерических ферментов:

- а) являются ключевыми ферментами метаболических путей.
- б) имеют пространственно разделенные активный и регуляторный центры;
- в) как правило, являются олигомерными белками;

- г) не проявляют регуляторные свойства при диссоциации молекулы на протомеры;
- д) при взаимодействии с лигандами происходит кооперативное изменение субъединиц.

12. Какие из выбранных в упражнении 11 (см. выше) особенностей строения и функционирования аллостерических ферментов подтверждают следующие данные?

Обнаружено, что кратковременное выдерживание большинства аллостерических ферментов при температуре выше комнатной (50–60 °С) приводит к потере чувствительности к действию аллостерических эффектов при сохранении ферментативной активности. Например: аспартаткарбамоилтрансфераза (молекула состоит из 12 протомеров) после выдерживания в течение 4 мин при 60 °С теряла чувствительность к ингибитору (ЦТФ) при сохранении ферментативной активности. При этом происходила диссоциация фермента на отдельные протомеры.

13. В настоящее время широко применяются микроинкапсулированные ферменты (уреаза, стрептокиназа), то есть связанные (иммобилизованные) с синтетическими полимерами. Как изменяются свойства ферментов в результате такой обработки:

- а) предотвращается выход ферментов из капсулы;
- б) повышается стабильность фермента;
- в) низкомолекулярные субстраты и продукты легко проходят через стенки капсулы;
- г) ослабляются антигенные свойства ферментов.

14. Сладкий вкус зерен в свежесобранных початках кукурузы обусловлен высоким содержанием в них сахара. Кукуруза, которую продают через несколько дней после сбора, имеет более низкую сахаристость, так как около 50% свободного сахара в зернах превращается в крахмал в течение одного дня хранения. Чтобы сохранить сладкий вкус кукурузы, очищенные початки помещают на несколько минут в кипящую воду (бланшируют), а затем охлаждают в холодной воде. Кукуруза, обработанная таким образом и хранящаяся в замороженном виде, сохраняет свой сладкий вкус. В чем биологическая основа этой обработки?

15. Фермент уреазы повышает скорость гидролиза мочевины при pH 8,0 и 20 °С в 10^{14} раз. Если данное количество уреазы может полностью гидролизовать данное количество мочевины при указанных условиях за 5 мин, сколько времени потребовалось бы для полного гидролиза мочевины в тех же условиях без уреазы? Предполагается, что обе реакции проходят в стерильных условиях без доступа бактерий.

16. Активный центр фермента обычно представляет собой «карман» на поверхности фермента, выстланный боковыми цепями аминокислот, необходимыми для связывания субстрата и катализа его химического превращения. Молекула карбоксипептидазы, последовательно отщепляющей С-концевые аминокислотные остатки от субстратов (пептидов), состоит из одной полипептидной цепи (307 аминокислотных остатков). Три главные каталитические группы в активном центре – это аргинин 145, тирозин 248 и глутаминовая кислота 270 (номер указывает на положение аминокислоты в аминокислотной последовательности фермента).

- а) если бы карбоксипептидаза представляла собой идеальную α -спираль, то на каком расстоянии (в нм) друг от друга находились бы аргинин 145 и тирозин 248; аргинин 145 и глутамат 270?
- б) объясните, каким образом эти три аминокислоты, расположенные так далеко друг от друга в полипептидной цепи, могут катализировать реакцию, участники которой занимают пространство размеров в несколько десятых нанометра;
- в) если в процессе гидролиза участвуют эти три каталитические группы, для чего ферменту необходимо иметь так много аминокислотных остатков.

17. В лаборатории два студента независимо друг от друга выделили фермент ЛДГ из сердца цыпленка. Фермент был получен в виде концентрированного раствора. Затем оба студента измерили ферментативную активность полученных ими растворов в одних и тех же условиях при разных концентрациях субстрата и таким образом определили V_{\max} и K_M своих препаратов. При сравнении результатов они обратили внимание на то, что значения K_M у них совпадали, а значения V_{\max} существенно различались. Один из студентов утверждал, что разные значения V_{\max} свидетельствуют о том, что они получили разные формы одного и того же фермента. Другой же утверждал, что несмотря на разные значения V_{\max} , они выделили одну и ту же форму фермента. Кто из них прав? Объясните, как можно разрешить эти противоречия.

18. Уравнение Михаэлиса–Ментен:

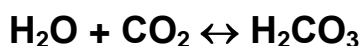
- а) при какой концентрации субстрата фермент, для которого максимальная скорость превращения субстрата составляет 30 мкмоль/мин·мг, а величина K_M равна 5 мМ, будет работать со скоростью равной 1/4 от максимальной?
- б) определите, какую долю V_{\max} будет составлять скорость реакции при концентрациях субстрата, равных $1/2 K_M$, $2 K_M$ и $10 K_M$.

19. При определении каталитической активности пептидазы из тонкого кишечника, гидролизующей дипептид глицилглицин, были получены следующие экспериментальные данные:

[S], мМ	1,5	2,0	3,0	4,0	8,0	16,0
Продукт, мг/мин	0,21	0,24	0,28	0,33	0,40	0,45

По этим данным определите графическим путем величины K_M и V_{max} для этого препарата фермента.

20. Карбоангидраза эритроцитов, имеющая молекулярную массу 30000, один из самых активных ферментов, известных в настоящее время. Она катализирует обратимую реакцию гидратации CO_2 , которая играет важную роль в транспорте CO_2 из тканей в легкие:



Рассчитайте число оборотов карбоангидразы, если при оптимальных условиях 10 мкг чистой карбоангидразы катализируют гидратацию 0,30 г CO_2 в 1 мин при 37 °С.

21. Метанол (древесный спирт), который когда-то использовался как антифриз для автомобилей, очень токсичен: прием внутрь лишь 30 мл метанола может привести к смерти. Такая необычайно высокая токсичность метанола обусловлена не столько действием самого метанола, сколько продукта его метаболизма – формальдегида. Метанол быстро окисляется до формальдегида под действием фермента печени алкогольдегидрогеназы. Один из методов лечения при отравлении метанолом состоит в том, что больному назначают этанол либо внутрь, либо внутривенно в количествах, которые у здорового человека вызывают интоксикацию. Объясните, почему такое лечение оказывается эффективным?

22. Ферментативная активность лизоцима максимальна при pH 5,2 и уменьшается как при снижении, так и при повышении этого значения pH. Лизоцим содержит в активном центре два аминокислотных остатка, необходимых для катализа: глутаминовую кислоту в положении 35 и аспарагиновую кислоту в положении 52. Величины pK' карбоксильных групп боковых цепей этих двух остатков равны соответственно 5,9 и 4,5. В каком ионизированном состоянии (протонированном или депротонированном) находится каждый из этих аминокислотных остатков в оптимуме pH лизоцима?

23. Липаза в жировой ткани может находиться в двух формах с различной активностью: в виде простого белка и в виде фосфопротеина. Объясните, каким путем происходит переход одной формы в

другую и почему этот переход сопровождается изменением активности.

24. 1 мг фермента сукцинатдегидрогеназы за 5 мин катализируют окисление янтарной кислоты с образованием 10 мкмоль фумаровой при 37 °С и рН 7,0. Рассчитайте активность фермента в оптимальных условиях. Объясните, как и почему изменится активность фермента, если:

- а) рН инкубационной смеси 4,0;
- б) к среде добавить малоновую кислоту;
- в) в присутствии малоновой кислоты увеличить концентрацию янтарной кислоты.

25. Вязкость гнойного содержимого зависит от концентрации макромолекул в его составе.

- а) с чем связано применение протеолитических ферментов при обработке гнойных ран?
- б) объясните механизм действия дезоксирибонуклеазы при лечении гнойных бронхитов.

РАЗДЕЛ 5

ВИТАМИНЫ, СТРОЕНИЕ, КОФЕРМЕНТНЫЕ ФОРМЫ И ФУНКЦИИ В ОРГАНИЗМЕ

Актуальность

Витамины – разнообразные по своему химическому строению низкомолекулярные соединения, которые не выполняют пластическую и энергетическую функции, в организме человека не синтезируются и по этому признаку относятся к незаменимым пищевым факторам. Роль водорастворимых витаминов в жизнедеятельности организма связана с участием их в качестве коферментов, обеспечивающих нормальное протекание биохимических реакций. При недостаточности поступления (или иным причинам) того или иного витамина в организме развивается специфическое заболевание, называемое гиповитаминозом и связанное, как правило, с нарушением деятельности или активности ферментных систем. Потребность человека в витаминах зависит от пола, возраста, физиологического и физического состояния, характера пищи и других факторов. Знание биологической роли витаминов, клинической картины гиповитаминозов, умение предотвращать и диагностировать эти заболевания очень важны для врача.

Цель

Научиться использовать знания о роли витаминов в обмене веществ для объяснения происхождения гипер- и гиповитаминозов и их предупреждения.

Необходимо знать:

1. Что такое витамины и почему они так называются? Источники витаминов.
2. Структурные формулы жирорастворимых витаминов, витаминов В₁, В₂, В₆, РР, С, Н, Q, пантотеновой и липоевой кислоты.
3. Классификация коферментов по структурно-физиологическим признакам и функциональным свойствам.
4. Коферменты — производные витаминов для различных классов ферментов (оксидоредуктаз, трансфераз, лиаз, изомераз, лигаз).

Необходимо уметь:

1. Приготовить экстракт жиро- и водорастворимых витаминов из различных источников.

2. Определять концентрацию водорастворимых витаминов в лекарственных препаратах, пищевых продуктах и биологическом материале.

Вопросы для самоподготовки:

1. Определение понятий «авитаминоз», «гиповитаминоз», «гипервитаминоз».
2. Принцип классификации витаминов.
3. Жирорастворимые витамины. Механизм влияния на обменные процессы в организме.
4. Водорастворимые витамины. Коферментные формы и функции.
5. Какие заболевания возникают из-за отсутствия в пище витаминов А, D, К, Е?
6. Каковы специфические признаки авитаминозов, вызванных отсутствием в пище витаминов В₁, В₂, В₆, РР, С?
7. Предшественники витамина D растительного и животного происхождения. Что необходимо для превращения провитамина D в витамин D?
8. Почему при недостаточности желчеобразования могут возникать гиповитаминозы, какие?
9. Почему витамин К не оказывает влияния на свертывающую активность крови в пробирке?
10. Какие продукты следует рекомендовать при А-гиповитаминозе, D-гиповитаминозе, Е-гиповитаминозе?

Задание: Заполните таблицу для водорастворимых витаминов по приведенной схеме:

Название витамина	Коферментная форма	Для какого класса ферментов характерны, пример реакции	Механизм действия кофермента	Признаки гиповитаминоза и авитаминоза	Лекарственные формы

Заполните таблицу с указанием функции жирорастворимых витаминов.

Название витамина	Активная форма	Биохимические функции	Признаки гипер- и гипо- витаминоза	Лекарственные формы

ТЕМА 5.1. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНОВ В РАЗЛИЧНЫХ ПРОДУКТАХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

Содержание витаминов в биологических жидкостях крайне мало, поэтому современные способы количественного определения витаминов основаны на применении высокоспецифичных и чувствительных иммуноферментных методов (чаще всего иммунохемилюминесцентный анализ) или тонкослойной хроматографии.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Определение витаминов группы В в лекарственных препаратах или биоматериале методом тонкослойной хроматографии

Принцип метода:

Определение витаминов проводят с помощью тонкослойной восходящей распределительной хроматографии.

Ход работы:

Хроматографическую камеру заранее насыщают смесью растворителей: бутанол: хлороформ: метанол: ледяная уксусная кислота: вода в соотношении 8,0:1,5: 2,0:2,5.

В качестве стандартов используют чистые препараты витаминов В₁, В₆, В₁₂ («Sigma»).

В качестве твердого носителя используют пластинки «Сорбфил», ПТСХ-УФ.

Перед работой пластинки промывают смесью хлороформ: ме-

танол (1:1), высушивают при комнатной температуре 15 мин и активируют при 110 °С в течение 30 мин.

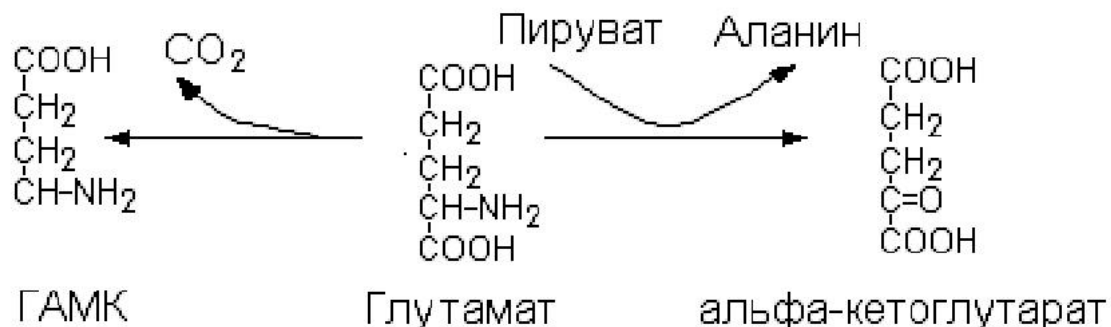
После проведения хроматографии визуализацию пятен (темная окраска на зеленом фоне) на хроматограмме проводят на денситометре при длине волны 254нм.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. При длительном приеме сульфаниламидов или антибиотиков у человека может возникнуть гиповитаминоз В₆. Чем это обусловлено:

- нарушением включения витамина в кофермент;
- недостатком витамина в пище;
- нарушением всасывания витамина;
- подавлением микрофлоры кишечника.

2. Количество витамина В₁, содержащегося в основном в оболочке семян хлебных злаков, существенно уменьшается при получении муки высших сортов. Преобладание в пище очищенных круп или хлеба, выпеченного из муки высших сортов, приводит к гиповитаминозу В₁. Изменится ли при таком гиповитаминозе скорость реакций, изображенных на схеме?



3. Недостаток никотиновой кислоты в пище приводит к заболеванию пеллагре

- суточная потребность взрослого человека в никотиновой кислоте, составляющая 7,5 мг, уменьшается, если в пище содержится большое количество аминокислоты триптофана. Что можно сказать о взаимосвязи между никотиновой кислотой и триптофаном на основе этого метаболизма?
- в конце прошлого и в начале нашего столетия пеллагра была довольно распространенным заболеванием, особенно в сельских местностях на юге США, где люди употребляли в пищу мало мяса, а питались в основном кукурузой. Объясните, почему такое питание приводило к недостаточности никотиновой кислоты?

4. В ставших классическими экспериментах, голуби, содержащиеся на экспериментальной диете, утрачивали координацию движений и способность удерживать свое тело в равновесии. Уровень пирувата в крови и мозге этих птиц значительно превышал нормальный. Такое состояние проходило, если голубям давали мясо. Объясните эти наблюдения.

5. *Lactobacillus casei* – представители семейства бактерий, используемых для получения таких продуктов брожения, как йогурт, квашенная капуста и соленья, не способны синтезировать рибофлавин. Характерное свойство этих бактерий заключается в том, они получают энергию за счет расщепления глюкозы до молочной кислоты ($pK' = 3,5$). Какой метод количественного определения рибофлавина Вы предложили бы исходя из этой информации.

6. Бактерии *Lactobacillus casei* способны расти на простой культуральной среде, содержащей витамины рибофлавин и пиридоксин и четыре 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.

7. Яйца можно держать в холодильнике от четырех до шести недель, не опасаясь, что они испортятся. Если же отделить яичные желтки от белков, то они быстро портятся даже при низкой температуре.

- а) почему портятся желтки?
- б) как вы объясните тот факт, что наличие яичных белков предотвращает порчу желтков?
- в) какую пользу с биологической точки зрения приносит птицам такой способ защиты яиц?

8. Бактерии *Streptococcus faecalis*, обитающие в толстом кишечнике, нуждаются в фолиевой кислоте. Если в питательной среде содержатся аденин и тимин, то бактерии могут хорошо расти и при отсутствии фолиевой кислоты. Исследование бактерий, выращенных в таких условиях, показало, что они не содержат фолиевой кислоты. Почему бактерии нуждаются в фолиевой кислоте? Почему потребность в фолиевой кислоте исчезает при добавлении в культуральную среду аденина и тимина?

9. Значительная часть веса наземных растений составлена нерастворимыми полисахаридами, главный из которых – целлюлоза. Хотя большинство животных не имеет ферментов, необходимых для пе-

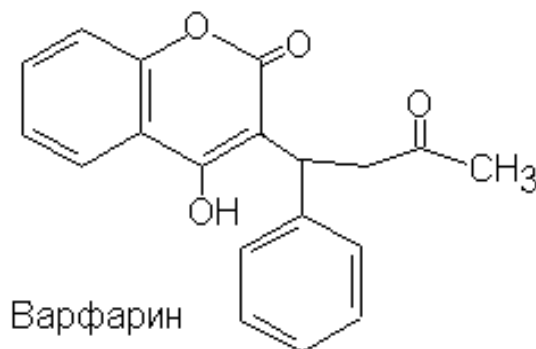
реваривания целлюлозы, жвачные (например, коровы, лошади, овцы и козы) используют микроорганизмы для предварительного переваривания травянистых растений и листьев деревьев. В отличие от других животных жвачным необходимо в больших количествах кобальт. В тех местах, где содержание кобальта в почве невелико (например, в Австралии), недостаточность кобальта у крупного рогатого скота представляет серьезную проблему. Объясните, почему жвачным животным необходим кобальт?

10. Витамины А и D можно применять сразу за один прием в таком количестве, которого достаточно для поддержания их нормального уровня в течение нескольких недель; витамины же группы В необходимо применять значительно чаще. Почему?

11. Недостаточность витамина А вызывает ксерофтальмию – заболевание, сопровождающееся потерей зрения. Дети в значительно большей степени подвержены этому заболеванию, чем взрослые. В тропических странах от ксерофтальмии слепнут десятки тысяч детей в возрасте от 18 до 36 месяцев. В тоже время у взрослых, добровольно находившихся на диете без витамина А, отмечалось лишь ослабление зрения в условиях пониженной освещенности. После введения витамина А этот дефект зрения быстро исчезал. Объясните, чем обусловлены различия в проявлении недостаточности витамина А у взрослых и детей.

12. У больных с поврежденными почками, несмотря на нормально сбалансированную диету, часто развивается почечная остеодистрофия – рахитоподобное заболевание, сопровождающееся интенсивной деминерализацией костей? Почему повреждение почек приводит к деминерализации?

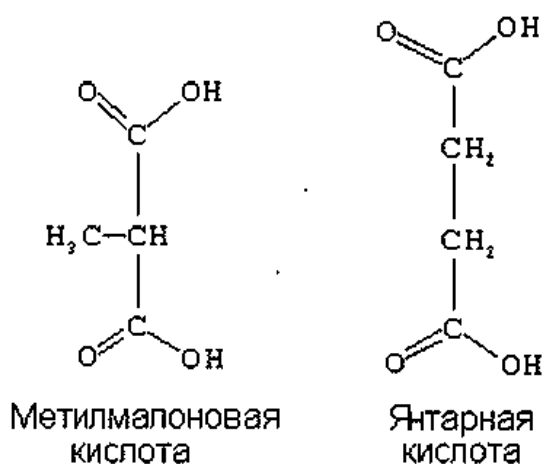
13. Варфарин – фармацевтический препарат, применяемый для борьбы с грызунами, является мощным ингибитором витамина К; его введение в организм блокирует действие витамина К.



а) предложите молекулярный механизм действия варфарина в качестве антагониста витамина К;

- б) почему скормливание грызунам варфарина приводит к их гибели?
- в) если коров или лошадей кормить неправильно приготовленным клевером, то у них развивается заболевание, сопровождающееся сильными внутренними кровотечениями. Было установлено, что причиной этого служит дикумарол – вещество, образующееся в результате действия микроорганизмов на кумарин – обычный компонент клевера. В клинической практике дикумарол используют для лечения больных с острым тромбофлебитом (образование кровяных сгустков, закупоривающих просвет сосуда). Объясните принцип этого лечения.

14. У больных с клиническими проявлениями ацидоза в моче были обнаружены значительные количества метилмалоновой кислоты. Известно, что при скормливании здоровым животным метилмалоновой кислоты она превращается в янтарную кислоту. Как Вы объясните эти наблюдения?



15. В некоторых странах Ближнего Востока, главным образом в Иране и Египте, у людей встречаются случаи недостаточности цинка. Это объясняется тем, что население в этих странах употребляет в пищу большое количество хлебных злаков, для которых характерно высокое содержание фитиновой кислоты (миоинозитолгексафосфата), очень прочно связывающей катионы двухвалентных металлов, особенно ионы Zn^{2+} .

- а) почему употребление хлебных злаков приводит к недостаточности цинка?
- б) недостаточность цинка особенно часто наблюдается в отдаленных деревнях, где люди пекут хлеб из пресного не дрожжевого теста. В городах, где в пищу употребляют хлеб из дрожжевого теста, недостаточность цинка встречается значительно реже. Объясните эти наблюдения.

16. Когда человек переходит на рацион с высоким содержанием белка, у него возрастает потребность в витамине B_6 . Дайте возможные объяснения этому явлению.

РАЗДЕЛ 6

СТРУКТУРА И ОБМЕН НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Актуальность

Нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК) – высокомолекулярные биополимеры, обнаруживаемые во всех типах клеток. Они выполняют в организме ряд важнейших функций: обеспечивают хранение и передачу генетической информации, участвуя в механизмах, при помощи которых эта информация реализуется в процессе синтеза белков.

Структурными единицами нуклеиновых кислот являются мононуклеотиды, состоящие из гетероциклических азотистых оснований (пуриновых и пиримидиновых), пентоз и фосфорной кислоты. Нуклеиновые кислоты делят на два типа: рибонуклеиновые (РНК) и дезоксирибонуклеиновые (ДНК). ДНК и РНК отличаются особенностями химического строения входящих в их состав пентоз и пиримидиновых оснований, локализацией в клетке и функциональным назначением в клеточном метаболизме.

Изучение физико-химических свойств ДНК является актуальным для дальнейшего освоения методов молекулярной биологии и биотехнологии, исследования мутагенных свойств инфекционных агентов, стабильности генома при воздействии экологически неблагоприятных факторов (токсических веществ, соединений тяжелых металлов, радиации) внешней среды.

ТЕМА 6.1. ВЫДЕЛЕНИЕ, ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА, ЧИСТОТЫ И НАТИВНОСТИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Цель

Изучить физико-химические особенности ДНК и РНК, освоить методы выделения нуклеиновых кислот из биологического материала, определения их концентрации.

Необходимо знать:

1. Химический состав нуклеиновых кислот, структуру азотистых оснований, нуклеотидов и нуклеозидов, типы связей.
2. Структуру ДНК, РНК. Правило Чаргаффа. Модель Уотсона-Крика. Физико-химические свойства ДНК и РНК (молекулярная масса, оптическая активность, вязкость, температура плавления).

Необходимо уметь:

1. Знать различные принципы выделения нуклеиновых кислот.
2. Приготовить гомогенат из печени крысы.
3. Проводить кислотный гидролиз ДНК и щелочной гидролиз РНК.
4. Определять чистоту и нативность полученного препарата ДНК.
5. Определять содержание нуклеиновых кислот в биологическом материале колориметрическим и спектрофотометрическим методами.

Вопросы для самоподготовки:

1. Внешний обмен нуклеопротеинов. Протеиназы и нуклеазы панкреатического сока, фосфодиэстеразы и фосфатазы кишечника.
2. Внутриклеточный катаболизм пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Образование мочевой кислоты. Конечные продукты обмена нуклеотидов.
3. Биосинтез пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Низкомолекулярные предшественники. Ключевые стадии биосинтеза.
4. Репликация ДНК. Предшественники для биосинтеза ДНК. Механизм ДНК-полимеразной реакции. Эндо- и экзонуклеазная активность ДНК-полимеразы. Теломеразы.
5. Процесс транскрипции. ДНК-зависимая РНК-полимераза.
6. Генетический код, свойства.
7. Адапторная функция аминоацил-тРНК-синтетазы – перенос линейной информации ДНК в пространственную структуру белка.
8. Строение рибосом; субъединицы, виды рРНК. Полисомы.
9. Инициация синтеза полипептидной цепи. Пептидильный и аминоацильный центры, стадии и факторы инициации, иницирующие аминокислоты и кодоны.
10. Элонгация синтеза. Стадии и факторы элонгации, ферменты.
11. Терминация синтеза. Стадии и факторы терминации, ферменты, стоп-кодоны.
12. Посттрансляционный процессинг полипептидной цепи: фосфорилирование, метилирование, карбоксилирование боковых радикалов, образование дисульфидных мостиков, добавление углеводных цепей, модификация N- и C-конца, удаление пептидных последовательностей.
13. Регуляция биосинтеза белка. Конститутивные и индуцибельные ферменты. Гипотеза Ф. Жакоба и Ж. Моно: понятие оперона, индуктор, репрессор, промотор, регуляторные и структурные гены.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 1

Выделение ДНК и РНК из печени крыс.

Разделение нуклеиновых кислот методом Шмидта и Тангаузера

Принцип

Метод основан на разной чувствительности ДНК и РНК к щелочному гидролизу: РНК, имея в своем составе рибозу при проведении щелочного гидролиза распадается на мононуклеотиды, тогда как ДНК остается относительно полимерной. ДНК гидролизуются при кипячении в хлорной кислоте.

Проведение анализа

1 г ткани печени гомогенизируют на холоде в 0,14 М растворе NaCl в соотношении 1:5, и добавляют к полученному гомогенату равный объем 0,5н раствор HClO₄.

Через 10 мин смесь центрифугируют при 2500 об./мин при охлаждении в течение 10 мин. Супернатант, содержащий нуклеотиды и низкомолекулярные производные азотистых оснований, отбрасывают.

Осадок (нуклеиновые кислоты, белки, липиды) промывают 5 мл этанол-хлороформной смеси (3:1), затем смесью этанол-эфир (1:1), затем эфиром, каждый раз центрифугируя пробу при 2500 об./мин при 10 мин, удаляя супернатант. В осадке остаются белки и нуклеиновые кислоты.

К полученному осадку добавляют 2 мл 0,5н раствора КОН и проводят щелочной гидролиз в течение 1 часа при 37 °С.

После гидролиза раствор охлаждают до 0 °С и добавляют концентрированной HClO₄ до конечной концентрации 0,5 М, продукты гидролиза РНК переходят в раствор. Пробу центрифугируют при 2500 об./мин.

В супернатанте определяют концентрацию РНК, а осадок используют для количественного определения содержания ДНК после кислотного гидролиза.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 2

Спектрофотометрический метод определения нуклеиновых кислот по А.С. Спирину

Принцип

Высокомолекулярные нуклеиновые кислоты характеризуются полосой поглощения с максимумом при 260 нм. Такое же положение максимума поглощения имеют все нуклеотиды, кроме цитидина, у которого максимум поглощения лежит при длине волны 270 нм.

Величина оптической плотности нативной молекулы ДНК при

260 нм на 40–50% ниже, чем суммарная оптическая плотность составляющих ее мононуклеотидов. Этот «гиперхромный эффект» связан с упорядоченным расположением азотистых оснований в двуспиральной структуре ДНК и позволяет определить нативность выделенного препарата нуклеиновой кислоты.

А.С. Спирин предложил проводить измерение светопоглощения кислотного гидролизата РНК и ДНК при 260 и 290 нм, поскольку ему удалось показать, что при этом нивелируются различия в нуклеотидном составе нуклеиновых кислот. Тогда концентрацию ДНК (мкг/мл) можно вычислить по формуле:

$$\text{Концентрация ДНК (мкг/мл)} = (E_{260} - E_{290}) : 0,02,$$

где: E_{270} , E_{290} – экстинкция гидролизата при длинах волн 270 и 290 нм.

Раствор ДНК с концентрацией 1мкг/мл имеет экстинкцию 0,020. Можно использовать также стандартный раствор ДНК в 1Н HClO_4 .

О чистоте выделенного препарата ДНК судят по соотношению оптических плотностей раствора при длинах волн, соответствующих максимуму поглощения разных азотистых оснований. Если отношение $E_{260}/E_{270} < 1,2$, а отношение $E_{270} / E_{290} > 2$, то препарат считается чистым и не содержит примесей нуклеотидного характера.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 3 **Фотокolorиметрические методы** **количественного определения нуклеиновых кислот**

Определение содержания ДНК методом Дише

Принцип

Метод основан на образовании окрашенного комплекса дезоксирибозы с дифениламином интенсивность которого пропорциональна концентрации этой пентозы в гидролизатах ДНК

Реактивы

1. Реактив Дише: 1 г дифениламина (дважды перекристаллизованного из 70% этилового спирта) растворяют в 100 мл ледяной уксусной кислоты (х.ч.) и добавляют 2,75 мл конц. H_2SO_4 (х.ч.).
2. 1н раствор HClO_4 .
3. Исследуемый раствор ДНК, содержащий 50–500 мкг/мл.
4. Стандартный раствор ДНК, 1 мг/мл.

Проведение анализа

Осадок ДНК, полученный из печени крыс, заливают 5 мл 0,5н раствора HClO_4 и нагревают в кипящей водяной бане в течение

15 мин. При этом продукты гидролиза ДНК переходят в раствор. К 1 мл раствора гидролизованной ДНК добавляют 2 мл реактива Дише и инкубируют на водяной бане при 100 °С в течение 10 мин для развития окраски. Пробу охлаждают и колориметрируют при 595 нм против HClO_4 .

Разводить перед измерением реакционную смесь нельзя. Если разведение все же необходимо произвести, то это можно сделать с помощью смеси: реактив Дише: вода (2:1).

Расчет

Содержание ДНК в исследуемом образце рассчитывают, пользуясь калибровочным графиком.

Построение калибровочного графика

Строится в пределах 100-500 мкг. Используется стандартный раствор ДНК, 0,5 мл которого предварительно смешивают с 0,5 мл 1н раствора HClO_4 . Гидролизуют 10 мин в кипящей водяной бане.

Схема построения калибровочного графика

№ пробы	Количество ДНК в пробе, мкг	Стандартный раствор ДНК, мл	Дистилл. вода, мл	1н раствор HClO_4 , мл		Реактив Дише, мл
Контроль	-	-	0,5	0,5	Гидролиз 10 мин при 100 °С	2,0
1	100	0,1	0,4	0,5		2,0
2	200	0,2	0,3	0,5		2,0
3	300	0,3	0,2	0,5		2,0
4	400	0,4	0,1	0,5		2,0
5	500	0,5	-	0,5		2,0

Пробы инкубируют 10 мин в кипящей водяной бане. Измеряют оптическую плотность при длине волны 595 нм против контроля.

Определение содержания РНК методом Мейбаума

Принцип

Метод основан на образовании окрашенного комплекса рибозы, входящей в состав РНК, с орцином. Интенсивность зеленого окрашивания пропорциональна концентрации РНК в растворе.

Реактивы

1. 0,1% раствор $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ в конц. HCl .
2. Раствор орцина в растворе FeCl_3 , 10 мг/мл. Готовят *ex tempore*.
3. Раствор РНК 100 мкг/мл.

Проведение анализа

К 1,5 мл раствора РНК добавляют 1,5 мл раствора орцина и нагревают смесь в течение 20 мин. на кипящей водяной бане. После охлаждения определяют поглощение при 670 нм (красный светофильтр). В качестве раствора сравнения используют холостую пробу.

Расчет

Количественное определение ведут с помощью калибровочного графика. График строят в диапазоне концентраций ДНК от 5 до 80 мкг.

Схема построения калибровочного графика

№ пробы	Количество РНК в пробе, мкг	Стандартный раствор РНК, мл	Дистилл. вода, мл	Раствор орцина, мл
Контроль	-	-	1,5	1,5
1	10	0,1	1,4	1,5
2	20	0,2	1,3	1,5
3	40	0,4	1,1	1,5
4	60	0,6	0,9	1,5
5	80	0,8	0,7	1,5

Нагревают смесь в течение 20 мин на кипящей водяной бане. После охлаждения определяют поглощение при длине волны 670 нм против контроля.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 4

Выделение ДНК из плазмы крови сорбентным методом на микроколонках стандартным набором реагентов фирмы «Биосилика»

Ход выполнения анализа

1. В пробирку «эппендорф» с крышкой внести 150 мкл образца плазмы и добавить два объема *Раствора для сорбции* (300 мкл). Пробирки плотно закрыть крышками и их содержимое перемешать с помощью встряхивателя «Vortex».
2. В чистую пробирку «эппендорф» установить специальную микроколонку с фильтром (использовать штатив). Внести на поверхность фильтра 100 мкл *раствора для промывки 1*. После впитывания раствора нанести на фильтр микроколонки весь объем смеси (образец + *раствор для сорбции*). Для этого с помощью автоматической пипетки тщательно собирают весь объем смеси (450 мкл) из пробирки после перемешивания (п. 1). Микроколонку вместе с пробиркой «эппендорф» центрифугиру-

- ют 1 мин при 5000 об./мин. На этом этапе (и последующих этапах 3–7) работы, выделяемая ДНК сорбируется на фильтре колонки, поэтому фильтрат из пробирки-приёмника выливают.
3. Микроколону устанавливают в опорожненную пробирку-приёмник, на фильтр наносят 300 мкл *раствора для промывки 1* и центрифугируют при тех же условиях. Из пробирки-приёмника снова удаляют фильтрат.
 4. Нанести на фильтр 500 мкл *раствора для промывки 2* и вновь центрифугировать при тех же условиях.
 5. Пункт 4 можно повторить для лучшей промывки образца, сорбированного на фильтре микроколони.
 6. Для удаления остатков *промывочного раствора* с фильтра микроколони, её, вместе с опорожненной пробиркой-приёмником, центрифугируют 1 мин при 12–13000 об./мин.
 7. Микроколону помещают в новую, чистую пробирку «эппендорф» и устанавливают вертикально в штатив.
 8. Наносят на фильтр (аккуратно по центру) 200 мкл дистиллированной воды.
 9. Инкубируют микроколону при комнатной температуре 3–5 мин, затем центрифугируют 1 мин при 12–13000 об./мин. В результате проведения этого этапа, ДНК с фильтра микроколони смывается в пробирку-приёмник.
 10. Микроколону удаляют. Полученный препарат ДНК (200 мкл в пробирке-приёмнике) готов для постановки ПЦР, секвенирования, рестрикции, лигирования и т. д.
 11. Концентрацию ДНК в препарате измеряют спектрофотометрически. Для этого объём препарата доводят дистиллированной водой до 1,0 мл (200 мкл образца + 800 мкл дистиллированной воды), поскольку минимальный объём любых образцов, необходимый для корректного измерения на спектрофотометре «СФ-2000», составляет 1,0 мл. В результате этого препарат разводится в 5 раз, что необходимо будет учесть при расчете!
 12. Измерение и расчет концентрации ДНК ведут согласно методу Спирина, который описан выше в данном Практикуме.

ВОПРОСЫ К СЕМИНАРУ

1. Внешний обмен нуклеопротеинов. Протеиназы и нуклеазы панкреатического сока, фосфодиэстеразы и фосфатазы кишечника.
2. Структура и свойства азотистых оснований, нуклеозидов и нуклеотидов. Роль нуклеотидов в обмене веществ.
3. Внутриклеточный катаболизм пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Образование мочевой кислоты. Конечные продукты распада пуринов и пиримидинов.

4. Биосинтез пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Низкомолекулярные предшественники. Ключевые стадии биосинтеза. Инозиновая и оротовая кислоты. Синтез дезоксирибонуклеотидов.
5. Структура нуклеиновых кислот, типы связей в ДНК и РНК. Виды РНК, строение, функции. Локализация и роль в клетке. Образование нуклеопротеинов, типы связей.
6. Генетический код, свойства.
7. Репликация ДНК. Предшественники для биосинтеза ДНК. Механизм ДНК-полимеразной реакции. Эндо- и экзонуклеазная активность ДНК-полимеразы. ДНК-лигаза.
8. Транскрипция. Синтез мРНК. ДНК-зависимая РНК-полимераза. Ретро-вирусы.
9. Адапторная функция аминоацил-тРНК-синтетазы – перенос линейной информации ДНК в пространственную структуру белка.
10. Строение рибосом; субъединицы, виды рРНК. Полисомы.
11. Инициация синтеза полипептидной цепи. Пептидильный и аминоацильный центры, стадии и факторы инициации, иницирующие аминокислоты и кодоны.
12. Элонгация синтеза. Стадии и факторы элонгации, ферменты.
13. Терминация синтеза. Стадии и факторы терминации, ферменты, стоп-кодоны.
14. Посттрансляционный процессинг полипептидной цепи: фосфорилирование, метилирование, карбоксилирование боковых радикалов, образование дисульфидных мостиков, добавление углеводных цепей, модификация N- и C-конца, удаление пептидных последовательностей.
15. Регуляция биосинтеза белка. Конституитивные и индуцибельные ферменты. Гипотеза Ф. Жакоб и Ж. Моно: понятие оперон, индуктор, репрессор, промотор, регуляторные и структурные гены.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Распределите перечисленные соединения по группам.

<ol style="list-style-type: none"> 1. Аденин. 2. Цитидин-5'-монофосфат. 3. Гуанозин. 4. Цитозин. 5. Аденозин. 6. Уридин. 7. Тимидин-5'-монофосфат. 	<ol style="list-style-type: none"> A. Нуклеозид. B. Азотистое основание. C. Нуклеотид.
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

2. Какие связи обеспечивают формирование первичной и вторичной структуры нуклеиновых кислот?

- | | |
|---------------------|------------------------------------------|
| 1. Гликозильные. | A. Характерны для первичной структуры. |
| 2. Сложноэфирные. | B. Характерны для вторичной структуры |
| 3. Простые эфирные. | C. Характерны для обоих типов структуры. |
| 4. Водородные. | D. Не характерны ни для одной из них. |
| 5. Гидрофобные. | |

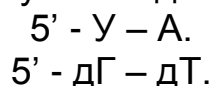
3. Какие особенности строения характерны для иной вторичной структуры ДНК?

- а) построена из двух полинуклеотидных цепей;
- б) цепи антипараллельны;
- в) азотистые основания цепей комплементарны друг другу;
- г) обе нити закручены в спираль, имеющую общую ось.

4. Выберите ответ, какими из перечисленных параметров различаются разные типы РНК:

- а) первичной структурой;
- б) молекулярной массой;
- в) вторичной структурой;
- г) способом соединения нуклеотидов в полинуклеотидной последовательности.

5. Напишите формулу динуклеотида следующего строения:



6. Выберите правильное описание свойств мРНК, поступающей из ядра в цитоплазму:

- а) является полным транскриптом соответствующих генов;
- б) имеет более короткую полинуклеотидную цепь, чем первичный транскрипт гена;
- в) при молекулярной гибридизации с ядерной днк дает совершенные гибриды;
- г) при гибридизации не дает совершенные гибриды.

7. Подберите к перечисленным функциям соответствующие нуклеиновые кислоты.

- | | | |
|--------------------------------------------------------------------|--|---------|
| а) служат адапторами аминокислот к кодонам мРНК; | | A. мРНК |
| б) осуществляют передачу генетической информации дочерним клеткам; | | B. ДНК |
| в) являются структурными компонентами рибосом; | | C. тРНК |
| | | D. рРНК |

- г) служат матрицами для синтеза белка;
- д) служат матрицами для синтеза РНК.

8. Подберите для каждого матричного биосинтеза соответствующую матрицу.

- | | |
|-----------------|----------------|
| 1. Синтез белка | A. ДНК |
| 2. Синтез тРНК. | B. мРНК |
| 3. Синтез ДНК. | C. тРНК |
| 4. Синтез рРНК. | D. Полипептиды |
| 5. Синтез мРНК. | |

9. Укажите для процесса репликации:

- а) матрицу;
- б) субстраты;
- в) источники энергии;
- г) фермент, обеспечивающий соединение дезоксирибонуклеотидов в биополимер;
- д) локализацию в клетке;
- е) фазу клеточного цикла, в которой происходит этот процесс.

10. При старении организма между гистонами и ДНК образуются ковалентные связи. Как могут повлиять эти изменения на синтез ДНК, РНК и белка в клетках разных тканей?

11. Выберите положения, правильно характеризующие свойства биологического кода:

- а) каждому кодону соответствует только одна аминокислота;
- б) одну аминокислоту могут кодировать несколько триплетов;
- в) смысл кодонов одинаков для всех живых организмов на Земле;
- г) каждой аминокислоте соответствует только один кодон;
- д) кодоны мРНК считываются в направлении от 5'- к 3'-концу.

12. Выберите положения, правильно характеризующие синтез, строение и функционирование адапторных молекул:

- а) синтезируются с использованием в качестве матрицы определенных участков ДНК;
- б) в молекуле есть четыре спирализованных участка и три или четыре одноцепочечные петли;
- в) необходимы для процесса транскрипции;
- г) имеют триплет, комплементарный кодону мРНК;
- д) к концевой 3'-ОН группе могут присоединять аминокислоты;
- е) каждая молекула адаптора может связываться только с определенной аминокислотой.

13. Адапторная функция тРНК определяется ее способностью специфически взаимодействовать с определенными субстратами. Укажите их.

1. мРНК.
2. ДНК.
3. Аминокислота
4. аминоацил-тРНК-синтетаза.
5. Белки рибосомных частиц.

14. Укажите, какие источники энергии используются на отдельных этапах биосинтеза белка.

- | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ol style="list-style-type: none">1. Образование пептидных связей.2. Присоединение матричной РНК к 40 S субчастице рибосомы.3. Присоединение мет-тРНК к мРНК и субчастицам рибосомы.4. Перемещение рибосомы по мРНК на 1 кодон.5. Освобождение белка с рибосом.6. Присоединение aa-тРНК к аминоацильному центру. | <ol style="list-style-type: none">A. Используется энергия АТФ.B. Используется энергия ГТФ.C. Используется энергия субстратов.D. Без затраты энергии. |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

15. Укажите для процесса трансляции:

- а) матрицу;
- б) субстраты;
- в) источники энергии;
- г) адапторные молекулы;
- д) частицы, являющиеся местом синтеза;
- е) локализацию в клетке.

16. ДНК-полимеразы могут выявлять и исправлять ошибки, тогда как РНК-полимеразы такой способностью, по-видимому, не обладают. Поскольку ошибка даже в одном основании как при репликации, так и при транскрипции может привести к ошибке в синтезе белка, можете ли Вы дать биологическое объяснение этому поразительному различию.

17. Определите минимальные энергетические затраты (в расчете на число высокоэнергетических фосфатных групп), необходимые для биосинтеза β -глобиновой цепи гемоглобина (146 остатков) из всех

аминокислот, АТФ и ГТФ. Сравните ваш ответ с расходами энергии на биосинтез линейной цепи гликогена, включающей 146 остатков глюкозы, соединенных $\alpha(1\rightarrow4)$ -связью, и синтезируемой из глюкозы в присутствии АТФ. Какова дополнительная энергетическая стоимость β -глобиновой молекулы, обусловленная тем, что в отличие от гликогена при ее построении необходимо реализовать определенную генетическую информацию.

18. В гемоглобине серповидных эритроцитов в 6-м положении β -глобиновой цепи вместо глутаминовой кислоты (присутствующей в нормальном гемоглобине А) обнаружен валин. Какое изменение, произошедшее в кодоне для глутаминовой кислоты, привело к ее замене на валин?

РАЗДЕЛ 7

УГЛЕВОДЫ. ОБМЕН УГЛЕВОДОВ

Актуальность

Углеводы – продукт фотосинтеза, структурный и запасной материал растений, важнейший продукт в питании животных и человека. Углеводы – основной источник метаболической энергии, преимущество сахаров в энергетическом обмене состоит в том, что они могут окисляться в анаэробных условиях. Углеводы участвуют в построении и функционировании клеточных мембран, входят в состав межклеточного вещества и обеспечивают адгезивные свойства клеток. Гликозилирование состояние различных белков меняет их функциональное состояние (гемоглобин, коллаген, большинство ферментов, рецепторы, факторы свертывающей системы крови). Углеводы выполняют гидростатическую, ион-регулирующую и другие важнейшие функции в организме. С изменениями углеводного обмена связаны тяжелые патологические состояния (сахарный диабет, гипер- и гипогликемические комы, гликогенозы и т. п.)

Цель

Изучить биологическую роль углеводов, процессы переваривания углеводов в желудочно-кишечном тракте, этапы промежуточного обмена, взаимосвязь с белковым и липидным обменами, регуляцию углеводного обмена.

Необходимо знать:

1. Структуру и свойства наиболее распространенных моно-, ди- и полисахаридов.
2. Функции углеводов в организме.
3. Внешний обмен углеводов.
4. Все этапы промежуточного обмена углеводов, механизмы реакций и ферменты, их катализирующие.
5. Энергетический баланс окисления глюкозы в анаэробных и аэробных условиях.
6. Регуляцию углеводного обмена и его взаимосвязи с белковым и липидным обменами.

Необходимо уметь:

1. Обнаруживать присутствие углеводов в биологическом материале.
2. Выделять гликоген из разных тканей, определять содержание гликогена в биологическом материале.

3. Определять содержание глюкозы различными методами.
4. Анализировать преимущества и недостатки методов определения углеводных метаболитов, обсуждать полученные результаты.

Вопросы для самоподготовки:

1. Классификация углеводов по структуре и физико-химическим свойствам. Классификация моносахаридов. Производные моносахаридов (уроновые кислоты, гликозиды, аminosахариды, фосфосахариды).
2. Структура и химические свойства важнейших моносахаров (глицеральдегид, диоксиацетон, эритроза, ксилулоза, рибулоза, рибоза, глюкоза, манноза, галактоза, фруктоза). N-ацетилмурамовая и N-ацетилнейраминовая кислоты.
3. Структура и химические свойства важнейших дисахаридов (сахароза, мальтоза, лактоза).
4. Структура и химические свойства важнейших гомополисахаридов (гликоген, крахмал, целлюлоза).
5. Структура и химические свойства важнейших гетерополисахаридов (гепарин, гиалуроновая кислота, хондроитин-4-сульфат и хондроитин-6-сульфат).
6. Биологические функции углеводов, происхождение их в организме.
7. Ферменты, гидролизующие углеводы в желудочно-кишечном тракте.
8. Механизм всасывания моносахаридов.
9. Судьба всосавшихся моносахаридов. Реакции взаимопревращения сахаров.
10. Депонирование углеводов в организме (локализация, ферменты, реакции, источники глюкозы).
11. Анаэробный гликолиз (этапы, ферменты, механизмы реакций, регуляция скорости процесса, энергетический эффект, судьба образованного НАДН, биологическое значение). Шунт Раппорта в эритроцитах.
12. Глюконеогенез: субстраты, пути утилизации молочной кислоты в организме. Цикл Кори.
13. Аэробный путь окисления глюкозы. Пируватдегидрогеназный мультиферментный комплекс. Судьба ацетил-S-КоА.
14. Цикл Кребса (роль оксалоацетата, ферменты, механизмы реакций, регуляция скорости, обратимость процесса, α -кетоглутаратдегидрогеназный мультиферментный комплекс, судьба образованного НАДН и ФАДН₂, судьба α -кетоглутарата, сукцината и оксалоацетата, энергетический эффект).
15. Анаплеротические (пополняющие) реакции.
16. Пентозофосфатный путь (этапы, ферменты, механизмы реак-

- ций, судьба образованных НАДФН и пентоз).
17. Механизмы субстратного фосфорилирования в гликолизе и цикле трикарбоновых кислот.
 18. Энергетический баланс окисления глюкозы в аэробных и анаэробных условиях. Эффект Пастера.
 19. Витамины и коферменты, участвующие в обмене углеводов.

Задания:

1. Составить схему «метаболических перекрестков» для глюкозо-6-фосфата, пирувата, оксалоацетата.
2. Написать реакции гликолиза, окисления пирувата и ЦТК и сравнить энергетический эффект окисления глюкозы в анаэробном и аэробном этапах.

ТЕМА 7.1. МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ОПРЕДЕЛЕНИЮ КОНЦЕНТРАЦИИ ГЛЮКОЗЫ В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

В клинической практике исследуется концентрация глюкозы в крови. К определению концентрации других сахаров и гликогена прибегают значительно реже. В крови человека глюкоза распределена между плазмой и её форменными элементами.

К методам определения концентрации глюкозы в крови можно отнести:

1. Редуктометрические методы, например метод Хагедорна–Йенсена

Это титрометрический метод, который основан на свойстве глюкозы восстанавливать при кипячении в щелочной среде железистосинеродистую соль калия в железосинеродистую соль. О концентрации глюкозы судят по избытку железистосинеродистого калия, определяемому йодометрическим титрованием. Метод не отличается строгой специфичностью, но его преимуществом является дешевизна и возможность использования в любой лаборатории.

Следует подчеркнуть, что методы этой группы дают завышенные результаты (примерно на 20–25%), так как в крови присутствует ряд соединений, не относящихся к углеводам, но обладающих восстановительными свойствами: мочевая кислота, глутатион, креатинин, аскорбиновая кислота. Поэтому методы данной группы имеют в настоящее время сугубо историческое значение.

2. Колориметрические методы. К их числу относятся:

- **Антроновый метод Морриса и Роз.** Основан на дегидратации глюкозы под действием серной кислоты и её превращения в оксиметилфурфурол, который конденсируется с антроном в соединение, окрашенное в синий цвет.

• **Ортотолуидиновый метод**

Основан на том, что глюкоза при нагревании с ортотолуидном в присутствии серной кислоты дает сине-зеленое окрашивание.

Колориметрические методы определения глюкозы также утратили свое значения, поскольку в их основе лежат химические реакции с углеводами, которые не имеют достаточную специфичность и чувствительность.

3. Ферментативные методы, например глюкозооксидазный метод

Данный метод основан на окислении глюкозы до глюкуроновой кислоты, катализируемом ферментом глюкозооксидазой, с образованием перекиси водорода, концентрация которой может быть определена различными способами.

Глюкозооксидазный метод имеет наибольшее распространение в современных клинико-биохимических лабораториях, как наиболее специфичный и чувствительный.

4. Электрохимические методы

В этих методах используются специальные электроды, содержащие иммобилизованные ферменты, в частности, глюкозооксидазу и пероксидазу. Реакция регистрируется по количеству образованной перекиси водорода или по убыли кислорода, израсходованного на окисление глюкозы. Этот способ лежит в основе работы глюкометров – приборов для самоконтроля концентрации глюкозы в крови больными диабетом в домашних условиях.

5. Диагностические полоски

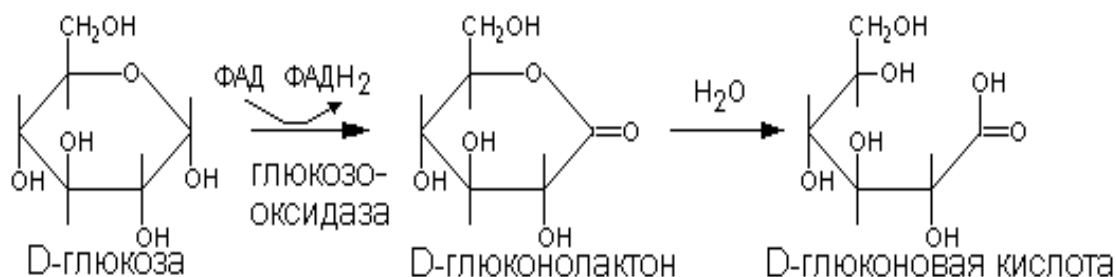
Метод «сухой» химии. Используется глюкозооксидазно-пероксидазная реакция и производные бензидина в качестве хромогена.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Определение содержания глюкозы глюкозооксидазным методом

Принцип

При окислении глюкозы глюкозооксидазой два атома водорода переносятся на ФАД^+ , который восстанавливается до ФАДН_2 и затем передает протоны на кислород с образованием эквимольного количества перекиси водорода:



4-аминоантипирин. Последний при этом меняет бесцветную окраску на розовую. Интенсивность возникшей окраски пропорциональна концентрации глюкозы.

Ход проведения анализа

Отмерить, мкл	Опытная проба	Калибровочная проба
Рабочий реагент, Буфер, ферменты и индикатор	1000	1000
Проба, капиллярная кровь, сыворотка или плазма, моча	10	-
Калибратор, раствор глюкозы с известной концентрацией	-	10

Пробы перемешивают, инкубируют 25 мин при 37 °С и измеряют оптическую плотность пробы и калибратора против рабочего реагента при длине волны 510 нм.

Исследование глюкозы в цельной крови предполагает использование депротеинизирующего раствора и центрифугирование для получения безбелковой надосадочной жидкости.

Концентрация глюкозы в крови человека в норме:

Цельная кровь	3,1–5,5 ммоль/л
Сыворотка и плазма	3,0–5,5 ммоль/л
Ликвор	
дети	3,33–4,44 ммоль/л
взрослые	2,75–3,85 ммоль/л

Оформление работы

Отмечают принцип метода определения концентрации глюкозы, результаты проведения анализа. Делают вывод о возможных патологиях.

ТЕМА 7.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МЕТАБОЛИТОВ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА В ТКАНЯХ

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 1

Выделение гликогена из биологического материала

Принцип

Метод основан на хорошей растворимости гликогена в воде и устойчивости его в слабокислой среде. Методика сводится к механическому разрушению ткани и экстракции гликогена 5% ТХУ с последующим осаждением спиртом.

Реактивы

1. 5% раствор ТХУ,
2. 96% этиловый спирт,
3. 2 н. раствор H_2SO_4 ;
4. 5 н. раствор $NaOH$.

Проведение работы:

500 мг печени (мозга, скелетных мышц) сытого или голодавшего не менее 12 часов животного быстро измельчают и растирают в ступке с 5 мл ТХУ в течение 10 мин на холоде.

Полученный гомогенат переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют 10 мин при 3000 об./мин. Надосадочную жидкость (экстракт гликогена) количественно переносят в мерную пробирку и добавляют равный объем 96% этанола. Содержимое пробирки перемешивают и помещают в кипящую водяную баню до появления осадка гликогена, центрифугируют 10 мин при 3000 об./мин.

Полученный осадок растворяют в 3 мл горячей дистиллированной воды и добавляют 3 мл раствора H_2SO_4 . Пробирку помещают в кипящую водяную баню для гидролиза гликогена на 1 час.

Охлажденный гидролизат нейтрализуют раствором $NaOH$ до рН 7,8–8,0, отмечая конечный объем. В полученном гидролизате определяют содержание глюкозы глюкозооксидазным методом.

Расчет:

Результат представляют в мг гликогена на 1 г ткани, переводя концентрацию глюкозы в пробе (ммоль/л) в мг, с учетом того, что 1 ммоль глюкозы равен 180 мг.

Оформление работы

Отмечают принцип метода, результаты проведения анализа. Делают вывод об обеспеченности ткани гликогеном, подсчитав процентное содержание гликогена в ткани.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 2 **Определение пировиноградной кислоты в мозге и печени крыс**

Принцип

Метод основан на образовании гидразона в результате взаимодействия пировиноградной кислоты с динитрофенилгидразином. Образующийся гидразон в щелочной среде дает окраску, интенсивность которой пропорциональна концентрации пирувата.

Реактивы

1. 5% и 20% раствор ТХУ;
2. 0,1% раствор 2,4-динитрофенилгидразина (ДНФГ): 100 мг ДНФГ растирают в ступке с 20 мл конц. HCl, количественно переносят в мерную колбу на 100 мл, доводят объём до метки дистиллированной водой и хранят в холодильнике во флаконе темного стекла;
3. толуол;
4. 10% раствор Na₂CO₃;
5. 1,5 н раствор NaOH;
6. 0,1% исходный раствор пировиноградной кислоты.

Проведение работы:

300 мг мозга (либо 500 мг печени, либо 1 мл сыворотки) растирают в ступке с 2 мл 20% ТХУ на холоде и ставят на лед (снег) на 10 мин для осаждения белка. Затем смесь центрифугируют в течение 5 мин при 3000 об./мин. Надосадочную жидкость переносят в чистую пробирку, а к осадку добавляют 1 мл холодной 5% ТХУ и центрифугируют 5 мин при 3000 об./мин. Надосадочную жидкость объединяют с предыдущей порцией, полученной в результате первого центрифугирования.

К общему объёму надосадочной фракции добавляют 1 мл ДНФГ и ставят на 20 мин в темноту. Затем добавляют 4 мл толуола, встряхивают 2 мин, нижний слой отсасывают и удаляют.

К толуоловому экстракту (верхний слой) добавляют 4 мл 10% раствора Na₂CO₃ и встряхивают 5 мин. Содержимому дают расслоиться. Нижний слой тщательно отбирают в чистую пробирку, добавляют 3 мл 1,5н раствора NaOH и перемешивают. Смесь приобретает красно-розовое окрашивание.

Оптическую плотность определяют с помощью фотоколориметра при длине волны 540 нм в кювете толщиной 1,0 см против слепой пробы.

Расчет:

Расчет содержания пировиноградной кислоты в исследуемом биообразце ведут с помощью калибровочного графика.

Построение калибровочного графика

Из исходного раствора пировиноградной кислоты (ПВК), 1 мл которого содержит 1 мг вещества (растворяют 25 мг ПВК или 31,5 мг натриевой соли ПВК в 25 мл H₂O) берут 1 мл и доводят дистиллированной водой до 100 мл. Получают рабочий раствор ПВК, который содержит 0,01 мг вещества в 1 мл.

Для построения калибровочного графика в сухие пробирки вно-

сят 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,8 мл рабочего раствора ПВК и доводят объем каждой пробы до 2 мл дистиллированной водой.

В каждую пробирку добавляют по 2 мл 20% раствора ТХУ, по 1 мл 5% раствора ТХУ и 1 мл ДНФГ, ставят в темноту на 20 мин. Далее пробы для калибровки обрабатывают, как опытные пробы.

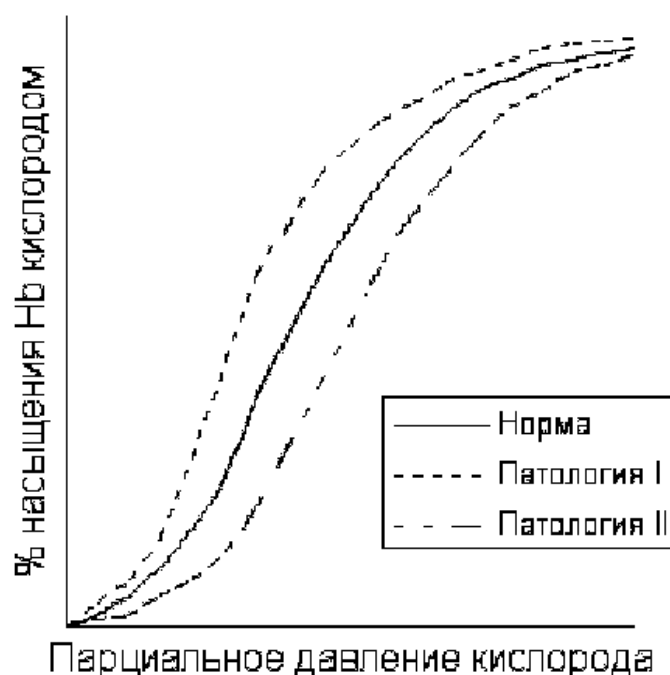
Оформление работы:

Отмечают принцип метода и результаты проведения анализа. Делают вывод об активности гликолиза в ткани.

Задания для самоконтроля

1. У некоторых лиц обнаружено наследственное изменение кривой связывания гемоглобина с O_2 . В эритроцитах таких больных изменяется концентрация 2,3-бисфосфоглицерата. Рассмотрите рисунок и ответьте на вопросы:

1. Как влияет 2,3-бисфосфоглицерат на сродство гемоглобина к O_2 ?
2. Как изменится концентрация 2,3-бисфосфоглицерата в случаях I и II?



2. Если кормление ребенка молоком вызывает расстройства ЖКТ, дефект какого фермента можно предполагать? Мотивируйте ответ. Как подтвердить ваше предположение?

3. Выберите субстраты глюконеогенеза, поясните на примере конкретных реакций: аланин, лейцин, лактат, пируват, α -кетоглутарат, пальмитиновая кислота, ацетил-S-CoA, глицерин.

4. Каково биологическое значение глюкозо-лактатного цикла (цикла Кори)? Нарисуйте его схему.

5. Каким образом регулируется скорость гликогенеза и распада гликогена? Могут ли эти процессы идти одновременно, с одинаковой скоростью? Мотивируйте ответ.

6. Сравните процессы распада гликогена в желудочно-кишечном тракте и в клетках внутренних органов? Что выгоднее для клетки: использование глюкозы крови или глюкозы, депонированной в виде гликогена?

7. В состоянии алкогольного отравления уменьшается уровень глюкозы и повышается концентрация лактата и кетоновых тел в крови. Объясните причины.

8. Какие изменения в метаболизме углеводов характерны для следующих состояний (подберите правильные ответы из правой части):

- | | |
|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| 1. Через 1–2 ч после приема пищи в состоянии покоя. | A. В печени усиливается распад гликогена. |
| 2. Бег спринтера на 200 м. | B. В печени усиливается синтез гликогена. |
| 3. Голодание в течение 2-х суток. | C. В липидах преобладает анаэробный распад глюкозы. |
| 4. Физическая работа в течение 3-х часов после обеда. | D. В мышцах усиливается аэробный распад глюкозы. |
| 5. Утром натощак. | E. В печени усиливается глюконеогенез из лактата. |
| 6. Острое алкогольное отравление. | F. В печени снижается скорость глюконеогенеза. |
| | G. В печени усиливается глюконеогенез из глицерина и аминокислот. |

9. Через 30 мин после съедания 100 г сахара содержание глюкозы в крови пациента возросло в 1,5 раза, а после употребления 100 г хлеба оно существенно не изменилось. Почему?

10. Как изменится соотношение между пентозофосфатным и гликолитическими путями обмена у больного, перенесшего кровотечение? Активность каких ферментов целесообразно проверить для проверки предположения?

11. Человек из средней полосы России приехал на Север, где местные жители кормили его только мясом, рыбой, жиром. Как он стал себя чувствовать? Почему?

12. Выполняя рекомендации врача, пациент двое суток не получал углеводов, однако значительного снижения уровня глюкозы крови не было. Какие механизмы стабилизируют уровень сахара крови, имеют ли они важное значение для жизнедеятельности?

13. Спортсмен пробежал стометровую дистанцию. Изменится ли содержание молочной кислоты в крови? Почему?

14. Один спортсмен пробежал на соревнованиях дистанцию 100 м, другой – 5000 м. У которого из них выше содержание молочной кислоты в крови?

15. Альпинист с большим трудом поднимался на вершину горы. Внезапно почувствовал головокружение, слабость, появился обильный пот. Какие процессы обмена нарушились, что нужно сделать, чтобы улучшить состояние альпиниста?

16. У грудного ребенка отмечена умственная отсталость, помутнение хрусталика. В крови и моче повышено содержание галактозы. О каком заболевании можно думать? Как кормить ребенка?

17. У новорожденного ребенка после кормления молоком наблюдались диспепсические расстройства (рвота, понос). После перевода на искусственное кормление раствором, содержащим глюкозу, наблюдаемые явления проходили. Возможной причиной заболевания является недостаточность активности одного из ферментов, участвующего в переваривании углеводов.

1. Назовите этот фермент.

2. Напишите схему реакции, которую он катализирует.

18. Употребление в пищу кондитерских изделий, конфет вызывает у ребенка рвоту, понос. Он плохо переносит и сладкий чай, тогда как молоко не вызывает отрицательных реакций. Выскажите предположение о молекулярном дефекте. Как проверить предположение?

19. У больного диагностирована язвенная болезнь желудка. Биохимическое исследование желудочного содержимого и крови показало уменьшение концентрации гексозоаминов, входящих в состав слизи желудка. Как увязать указанные факты с развитием этого заболевания?

- 20.** У голодающих животных и человека содержание гликогена в печени снижается очень быстро, а концентрация глюкозы в крови сохраняется в пределах нормы длительное время. Объясните механизм этого явления.
- 21.** При длительных физических нагрузках запасы гликогена истощаются не только в работающих, но и в неработающих мышцах. Обсудите механизм взаимосвязи обмена углеводов в работающих и неработающих мышцах.
- 22.** Нарушение окислительного фосфорилирования при ишемии миокарда приводит к снижению содержания в кардиомиоцитах АТФ. Как это снижение влияет на интенсивность гликолиза и гликогенолиза в кардиомиоцитах?
- 23.** Описано два типа заболеваний. Для одного характерен дефект фосфорилазы мышц, для другого – печени. Назовите признаки этих заболеваний. Как изменится концентрация лактата в крови после физической нагрузки? Какова реакция больных на введение глюкогона?
- 24.** Описано два типа заболеваний мышц. Один характеризуется дефектом фосфорилазы, другой – фосфофруктокиназы. Какие общие симптомы характерны для этих заболеваний?
- 25.** Известно, что люди, имеющие 1 группу крови, больше подвержены заболеваниям пептической язвой желудка и двенадцатиперстной кишки. Синтез каких белков и небелковых веществ угнетен у этой группы больных?
- 26.** Сколько молей АТФ может синтезировать гомогенат печени за счет энергии окисления глюкозы при следующих условиях:
- а) функционируют все элементы дыхательной цепи;
 - б) заблокирован водород-транспортный участок (функционируют только цитохромы);
 - в) разрушены митохондрии.
- 27.** Выберите положения, правильно характеризующие физиологическое значение анаэробного распада глюкозы:
- а) обеспечивает энергозатраты скелетных мышц в начальный период при выполнении срочной интенсивной работы;
 - б) активируется в сердечной мышце при заболеваниях с нарушением кровообращения и явлениями гипоксии;
 - в) характерен для метаболизма клеток злокачественных опухолей;

- г) является основным источником энергии для метаболизма эритроцитов;
- д) конечный продукт процесса выводится из организма;
- е) конечный продукт процесса подвергается дальнейшим превращениям.

28. Подберите особенности, характерные для аэробного окисления глюкозы и анаэробного гликолиза.

- | | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> 1. Процесс требует постоянной регенерации НАД⁺. 2. Акцептором водорода от НАДН является пируват. 3. Сопряжен с синтезом АТФ при участии электрон-переносящей цепи. 4. Является источником энергии для клеток, лишенных митохондрий. 5. Метаболиты процесса используются в анаболических процессах. 6. Конечным продуктом является лактат. 7. Протекает в цитозоле клеток. | <ul style="list-style-type: none"> A. Характерно только для аэробного гликолиза. B. Характерно только для анаэробного гликолиза. C. Характерно для обоих процессов. D. Для указанных процессов не характерно. |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

29. В опыте на гомогенатах мышечной ткани изучали анаэробный гликолиз. Как изменится скорость анаэробного распада глюкозы в этом опыте при добавлении в инкубационную смесь высоких концентраций перечисленных веществ? Перечислите регуляторные ферменты этого процесса.

- | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> 1. АДФ 2. АТФ 3. Сукцинат 4. Цитрат 5. Ацетил-КоА | <ul style="list-style-type: none"> A. Увеличится B. Уменьшится C. Не изменится |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

30. Производство шоколада с жидкой начинкой можно считать интересным примером использования ферментов в технике. Ароматная жидкая начинка представляет собой в основном водный раствор сахаров, обогащенный фруктозой, которая и придает ей сладкий вкус. Техническая проблема заключается в следующем: для приготовления шоколадной оболочки твердую центральную часть нужно окружить горячим расплавленным шоколадом и в тоже время конечный продукт должен содержать под застывшим шоколадом жидкую, бо-

гатую фруктозой начинку. Предложите решение этой задачи (Подсказка: сахароза растворяется значительно хуже, чем глюкоза и фруктоза).

31. Стебли тропической травы бамбука при оптимальных условиях могут расти феноменально быстро (примерно 30 см в день). Рассчитайте, сколько сахарных остатков в секунду должно ферментативно присоединиться к растущим целлюлозным цепям при такой скорости роста, если принять, что стебли бамбука почти целиком состоят из целлюлозных волокон, ориентированных по направлению роста. Длина каждого остатка D-глюкозы в молекуле целлюлозы составляет приблизительно 0,45 нм.

32. Летательные мышцы промысловых птиц (куропатки, перепела, фазаны) почти полностью обеспечиваются энергией за счет распада глюкозо-1-фосфата, который образуется при расщеплении гликогена под действием гликогенфосфорилазы. Скорость выработки энергии во время полета (в форме АТФ) лимитируется скоростью распада гликогена. Во время «панического полета» скорость распада гликогена у промысловых птиц очень высока и составляет около 120 мкмоль/мин глюкозо-1-фосфата в расчете на 1 г сырой ткани. Рассчитайте, как долго могут лететь промысловые птицы, если известно, что в их летательных мышцах содержится около 0,35% гликогена (по весу).

33. В эксперименте на культуре клеток печени изучали глюконеогенез из лактата. Как изменится концентрация глюкозы при добавлении в инкубационную смесь высоких концентраций перечисленных веществ?

- | | |
|-------------------------------------------|-----------------|
| 1. АДФ | A. Увеличится |
| 2. АТФ | B. Снизится |
| 3. Пируват | C. Не изменится |
| 4. АМФ | |
| 5. Авидин (ингибитор биотинных ферментов) | |
| 6. Малонат | |

34. Концентрация глюкозы в клетках млекопитающих невелика по сравнению с ее концентрацией в плазме крови. Объясняется это тем, что поступление глюкозы в клетки регулируется, и глюкоза быстро фосфорилируется в результате реакции с АТФ. В организме млекопитающих эту реакцию катализируют два разных фермента, заметно различающиеся по своим свойствам. В скелетных мышцах присутствует только один из них – гексокиназа. Этот фермент инги-

бируется глюкозо-6-фосфатом и характеризуется величиной $K=0,1$ мм. В печени помимо гексокиназы содержится также и глюкокиназа, которая здесь преобладает. Глюкокиназа характеризуется гораздо большей величиной $K_m=10,0$ мМ и не ингибируется глюкозо-6-фосфатом. Какое значение имеет различие в величине K_m для гексокиназы мышц и глюкокиназы печени? Как должны сказываться различия в свойствах этих двух ферментов на их физиологической роли в мышцах и печени?

35. При напряженной работе мышечная ткань потребляет гораздо больше АТФ, чем в состоянии покоя. В белых скелетных мышцах (мышцы ног у кролика, мышцы некоторых птиц) почти весь АТФ образуется в ходе анаэробного гликолиза. Представим себе, что в скелетной мышце отсутствует лактатдегидрогеназа. Могла бы в этом случае мышца напряженно работать и с большой скоростью генерировать АТФ путем гликолиза? Аргументируйте свой ответ.

36. В 1905 г. Гарден и Йонг провели серию исследований спиртового брожения, ставших классическими. Изучая сбраживание глюкозы до этанола и CO_2 под действием экстрактов пивных дрожжей, они установили следующее:

- 1) для сбраживания необходим неорганический фосфат; по исчерпанию запасов фосфата брожение прекращается еще до того, как будет использована вся глюкоза;
- 2) при брожении в этих условиях накапливается этанол, CO_2 и гексозодифосфат;
- 3) если заменить фосфат на арсенат, то гексозодифосфат не накапливается, но брожение продолжается до тех пор, пока вся глюкоза не превратится в этанол и CO_2 .

1. Почему при исчерпании запаса фосфата брожение прекращается?
2. Почему накапливается этанол и CO_2 ? Необходимо ли превращение пирувата в этанол и CO_2 ? Почему? Укажите, какой гексозодифосфат накапливается? Почему?
3. Почему замена фосфата на арсенат предотвращает накопление гексозодифосфата, но в то же время обеспечивает завершение брожения, то есть полное превращение глюкозы?

37. Гликоген-фосфорилаза из скелетных мышц характеризуется гораздо более высокой величиной V_{max} , чем тот же фермент из ткани печени.

1. Какую физиологическую функцию выполняет гликоген-фосфорилаза в скелетной мышце и ткани печени?
2. Почему величина V_{max} для мышечного фермента должна быть больше, чем для фермента из печени?

38. Препарат фторацетата, изготавливаемый промышленным способом, применяется как средство борьбы с грызунами. В природе фторацетат обнаружен в одном из южно-африканских растений. Проникнув в клетки, он превращается во фторацетил-КоА в реакции катализируемой ферментом ацетаттиокиназой. Для изучения токсического действия фторацетата был проведен эксперимент на изолированном сердце крысы. После перфузии сердца 0,22 мМ фторацетатом уменьшалось поглощение глюкозы, и снижалась скорость гликолиза, а глюкозо-6-фосфат и фруктозо-6-фосфат накапливались. Концентрации всех промежуточных продуктов ЦТК были при этом ниже нормы, и только концентрация цитрата превышала норму в 10 раз.

1. В какой точке блокируется цикл лимонной кислоты? Почему цитрат накапливается, а запас других промежуточных продуктов цикла истощается?
2. Фторацетил-КоА подвергается ферментативным превращениям в цикле лимонной кислоты. Какова структура конечного продукта обмена фторацетата? Почему он блокирует цикл лимонной кислоты? Как можно снять это ингибирование?
3. Почему после перфузии сердца фторацетатом уменьшается поглощение глюкозы и снижается скорость гликолиза? В чем причина накопления монофосфатов?
4. Почему отравление фторацетатом смертельно?

39. Около 80% всей глюкозы, синтезируемой в организме овцы, используется в вымени. Расходуется глюкоза на образование молока, главным образом на синтез лактозы, а также глицеролфосфата, необходимого для синтеза триацилглицеролов молока. Зимой при низком качестве корма образуется меньше молока и у овец иногда развивается кетоз, т.е. повышается концентрация кетоновых тел в плазме крови. Из-за чего происходят эти изменения? Обычно животным в таких случаях дают большие дозы пропионата. На чем основано его действие?

РАЗДЕЛ 8

ЛИПИДЫ. ОБМЕН ЛИПИДОВ

Актуальность

Липиды представляют собой обширный и гетерогенный класс веществ живых клеток. Как правило, липиды нерастворимы в воде, но растворяются в большинстве органических растворителей (этиловый спирт, хлороформ, эфир и т. д.). Наиболее важными функциями липидов являются:

- а) энергетическая (резерв метаболической энергии (триацилглицеролы);
- б) структурная (глицерофосфолипиды и сфинголипиды) — при соединении с белками или углеводами;
- в) защитная (триацилглицеролы, воска);
- г) регуляторная (витамин Д, стероиды). Знание о транспортных формах липидов в крови и процессах липидного обмена позволит понимать причины, лежащие в основе некоторых заболеваний и способы их диагностики.

Цель

Знакомство со строением, функциями и свойствами липидов, особенностями переваривания и промежуточным обменом. Понимание взаимосвязи липидного и углеводного обменов.

Необходимо знать:

1. Классификацию, структуру и функции всех классов липидов.
2. Внешний обмен липидов, механизмы всасывания, ресинтеза и транспорта.
3. Механизм реакций промежуточного обмена жирных кислот, нейтральных жиров, фосфолипидов, холестерина.
4. Методы выделения и определения липидных компонентов.

Необходимо уметь:

1. Определять содержание общих липидов, холестерина, триацилглицеролов.
2. Выделять различные фракции липидов из различных биологических материалов.
3. Выполнять хроматографическое разделение липидных фракций.

Вопросы для самоподготовки:

1. Классификация липидов по структуре. Насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты, нейтральные жиры, воска, терпены. Фосфолипиды (глицерофосфолипиды и сфинголипиды), гликолипиды. Стероиды.
2. Функции и физико-химические свойства липидов.
3. Значение жиров как пищевого продукта, их роль во всасывании витаминов. Витамин F.
4. Внешний обмен липидов: эмульгирование, липазы и фосфолипазы панкреатического сока, роль желчных кислот. Энтерогепатический цикл желчных кислот.
5. Всасывание продуктов гидролиза липидов в тонком кишечнике. Ресинтез жиров.
6. Транспорт липидов в крови. Липопротеины, классы, химический состав, функции, обмен липопротеинов (роль фосфатидилхолина, фермента лецитин-холестеролацилтрансферазы). Регуляция содержания липопротеинов в плазме крови.
7. Нарушения обмена липидов: гиперхолестеролемиа, гиперлипопротеинемия, атеросклероз, жировая инфильтрация печени, желчнокаменная болезнь. Дислипотеинемии. Наследственные нарушения обмена липидов.
8. β -окисление жирных кислот, локализация, значение, энергетический баланс.
9. Цикло- и липооксигеназные пути окисления жирных кислот, локализация, значение. Простагландины, тромбоксаны, простациклины, синтез, функции.
10. Биосинтез жирных кислот, нейтральных жиров и фосфолипидов, холестерина. Значение холестерина для организма.
11. Синтез и утилизация кетоновых тел.
12. Взаимосвязь липидного и углеводного обменов.
13. Методы определения содержания липопротеинов.
14. Выделение холестерина из ткани. Количественное определение холестерина, принцип методов.
15. Экстракция липидных фракций. Хроматографическое разделение липидов. Этапы, механизм очистки липидов от низкомолекулярных примесей, разделения и окраски.

Задания

1. Написать реакции окисления жирных кислот (пальмитиновой, олеиновой, с нечетным числом атомов углерода) и сравнить энергетический эффект окисления.
2. Написать реакции биосинтеза пальмитиновой кислоты и определить участие атомов C ацетила, малонила и CO_2 в конечном продукте.

ТЕМА 8.1. СТРУКТУРА, СВОЙСТВА И ФУНКЦИИ ЛИПИДОВ

Актуальность

Обладая общим свойством гидрофобности, липиды экстрагируются из биологического материала органическими растворителями. Однако, степень полярности разных классов липидов очень различна: от абсолютно гидрофобных эфиров холестерина, триацилглицеролов и восков до достаточно гидрофильных фосфолипидов. На этом основаны принципы выделения и разделения фракций липидов.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 1

Экстракция липидов из биологического материала и хроматографическое разделение липидных фракций

Экстракция общих липидов из сыворотки крови по Фолчу

Принцип

При небольшом нагревании смеси хлороформа, метанола и сыворотки крови все липиды экстрагируются из сыворотки органическими растворителями. После разделения фаз заряженные соединения (ионы, углеводы, белки, аминокислоты и т. п.) переходят в верхнюю (метанольную) фазу, а липиды остаются в нижней (хлороформной) фазе.

Реактивы

- 1) хлороформ-метанольная смесь (2:1),
- 2) 0,74% раствор KCl.

Проведение экстракции

В химические пробирки вносят 5,0 мл хлороформ-метанольной смеси и 0,2 мл сыворотки крови. Смесь тщательно взбалтывают в течение 5 мин и прогревают на водяной бане при температуре +40 °С.

Для освобождения от денатурированного белка экстракт фильтруют в мерные пробирки и промывают до исходного объема хлороформ-метанольной смесью.

Для лучшего разделения метанольной и хлороформ-липидной фракций добавляют 0,74% раствора KCl, приблизительно 1/5 от объема экстракта. Пробирки плотно закрывают притертыми пробками и сильно встряхивают, после этого оставляют на сутки.

Для более быстрого разделения фаз пробирки можно центрифугировать в течение 20 мин при 2500 об./мин.

После разделения фаз с помощью водоструйного насоса, соединенного трубкой с пастеровской пипеткой, аккуратно, не задевая нижний слой, удаляют верхнюю фазу и доводят объем нижней фазы 0,74% раствором KCl до первоначального уровня.

Определение содержания липидных фракций сыворотки крови методом тонкослойной хроматографии

Принцип

Полученный экстракт липидов наносят на линию «старта» пластинки, покрытую тонким слоем силикагеля, после чего пропускают по силикагелю хроматографическую смесь. Вещества с более высоким коэффициентом распределения (R_f) продвигаются от отметки «старта» к «финишу» с большей скоростью, отделяясь, таким образом, от веществ с более низким коэффициентом.

Реактивы

1. гептан,
2. хроматографическая смесь (объем:объем) = гептан:этиловый эфир : этилацетат (80:20:1,5),
3. 2% спиртовой раствор фосфорно-молибденовой кислоты,
4. концентрированная H_2SO_4 .

Проведение анализа

За час до начала разделения готовят стеклянную хроматографическую камеру. Для этого на дно камеры наливают смесь для хроматографии слоем высотой около 1,5 см и герметично закрывают камеру для насыщения её парами смеси. Если этого не сделать, то хроматографическая смесь, поднимаясь вверх по пластинке, будет испаряться, что не позволит достигнуть качественного разделения липидных фракций.

Пробирки с экстрактом общих липидов помещают в водяную баню при +70 °C (не выше!) и выпаривают досуха (до состояния неподвижной жировой капли). Осадок растворяют в 0,1 мл гептана. При помощи автоматической пипетки и пластикового носика-капилляра одним приёмом наносят весь объем экстракта (10–20 мкл) на линию «старта» пластинки «Silufol» в виде полосы на расстоянии не менее 1,5 см от нижнего края и 0,5 см от боковых краев пластинки. Необходимо стремиться получить возможно меньший размер пятна. Линию старта рекомендуют предварительно наметить простым (графитовым) карандашом.

Пластинку с нанесенным экстрактом помещают в хроматографическую камеру, насыщенную смесью, и наблюдают за движением фронта смеси. Как только фронт хроматографической смеси при-

близится к верхнему краю на 1–1,5 см, пластинку вынимают из камеры и высушивают на воздухе. Для проявления фракций липидов поверхность силикагеля равномерно опрыскивают фосфомолибденовой кислотой, высушивают на воздухе и прогревают в сушильном шкафу при температуре 80–100 °С до появления полос и пятен липидных фракций, окрашенных в синий цвет.

Учет результатов

Начиная от линии старта, фракции липидов располагаются в следующем порядке (см. схему):

1. Фосфолипиды.
2. Свободный холестерол.
3. Ди- и моноацилглицеролы.
4. Свободные жирные кислоты.
5. Триацилглицеролы.
6. Эфиры холестерола.

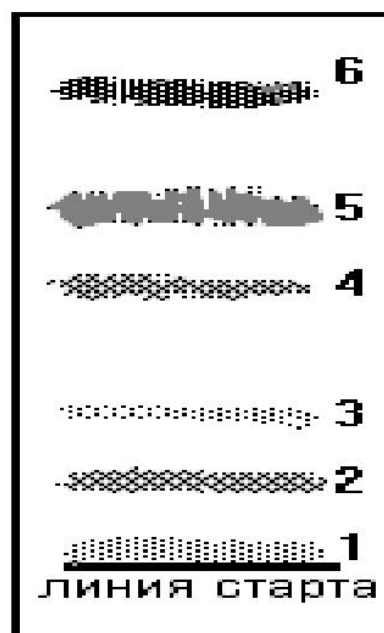


Схема расположения липидных фракций при хроматографическом разделении экстракта общих липидов сыворотки крови

Дополнительную идентификацию полученных липидных фракций можно осуществлять с помощью «свидетелей» (смесь чистого холестерина, жирной кислоты и т. п.), а также путем сравнения полученных R_f для каждой фракции со справочными данными.

Расчет

Количественную оценку каждой из липидных фракций можно осуществить:

1. С помощью денситометра. В этом случае результат выражают в % доле площади пятна (полоски) каждой фракции от суммы площадей всех фракций, принимаемой за 100%.
2. Проявленные (окрашенные) индивидуальные фракции, каждую

в отдельности, аккуратно счищают острым скальпелем в индивидуальные центрифужные пробирки и экстрагируют краситель равными объемами хлороформ-метаноловой смесью с добавлением 3 капель концентрированной серной кислоты для усиления окраски. Экстракты фотометрируют на колориметре при длине волны 540 нм против общей слепой пробы – экстракта порции силикагеля, счищенного с поверхности «фона» – участка хроматограммы, на котором отсутствуют пятна или полосы липидных фракций. Конечные результаты рассчитывают в % к общему содержанию липидов в сыворотке крови, принимаемому за 100%.

Оформление работы

Отмечают принцип метода распределительной (тонкослойной) хроматографии и результаты проведения анализа.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 2 **Выделение и идентификация** **липидных фракций яичного желтка**

Ход выполнения анализа

К $\frac{1}{4}$ части яичного желтка приливают 5 мл ацетона, предварительно охлажденного до температуры $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ или $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Смесью гомогенизируют 30 сек и центрифугируют в течение 5–10 мин при 3000 об./мин. Надосадочную жидкость отделяют, а осадок несколько раз ресуспендируют с ацетоном и снова центрифугируют при тех же режимах.

Суммарный ацетоновый экстракт нейтральных липидов и холестерина (достаточно 1 мл) упаривают на кипящей водяной бане до суха. Высушенную липидную каплю растворяют в 0,2 мл реактива Фолча (хлороформ:метанол = 2:1) или гептана и используют для тонкослойной хроматографии.

Хроматографическая смесь состоит из гептана: этилового эфира:этилацетата в объёмном соотношении 80:20:0,5.

Осадок высушивают на фильтровальной бумаге (с помощью аппарата ФОМК-1). Высушенный порошок растворяют в 15 мл 96% этанола, непрерывно помешивая в течение 1 часа. Центрифугируют 5–10 мин при 3000 об./мин. Надосадочную жидкость используют для хроматографического разделения фракций полярных липидов.

Хроматографическая смесь состоит из хлороформа:метанола:ледяной уксусной кислоты : воды в объёмном соотношении 50:60:1:4.

Процедура проведения хроматографии описана выше.

Для проявления фракций на пластинке её окрашивают 10%

спиртовым раствором фосфорно-молибденовой кислоты и высушивают в сушильном шкафу при 100 °С.

Расположение фракций на хроматограмме сравнивают с распределением на хроматограммах стандартных образцов липидов, полученных в аналогичных условиях разделения.

Фракции фосфолипидов располагаются от линии старта в следующем порядке: лизофосфолипиды, сфингомиелин, фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозин, фосфатидилэтаноламин.

Фракции нейтральных липидов располагаются от линии старта в следующем порядке: холестерол, свободные жирные кислоты, диацилглицеролы, моноацилглицеролы, эфиры холестерола.

ТЕМА 8.2. ВНЕШНИЙ ОБМЕН ЛИПИДОВ

Актуальность

Переваривание липидных компонентов пищи требует нескольких условий: эмульгирования с помощью желчных кислот, образующихся из холестерина в гепатоцитах и активности различных липаз поджелудочной железы. Единственной естественной эмульсией является только молоко, что важно для пищеварения у детей, у которых процесс переваривания липидов начинается уже в желудке. Желчные кислоты. Будучи амфипатичными молекулами участвуют также в процессе всасывания продуктов гидролиза липидов, формируя оболочку мицеллы вместе с фосфолипидами.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Влияние желчных кислот на эффективность гидролиза липидов

Принцип

Под действием липаз триглицериды и фосфолипиды распадаются на глицерин и свободные жирные кислоты. Эффективность гидролиза и влияние на этот процесс желчных кислот определяют, титруя свободные жирные кислоты щелочью в присутствии фенолфталеина.

Реактивы

1. Субстраты: молоко, растительное масло, желток яиц.
2. 0,1 М NaOH.
3. Фенолфталеин.
4. Раствор желчи.
5. Раствор панкреатина.

Ход работы

Реагенты, мл	Контроль, мл	Опыт 1, мл	Опыт 2, мл
Молоко (растительное масло, яичный желток)	1,0	1,0	1,0
Дистиллированная вода	3,0	2,0	1,0
Панкреатин	-	1,0	1,0
Желчь	-	-	1,0
Перемешать, инкубировать 15 мин при +37°C			
Фенолфталеин	1–2 капли	1–2 капли	1–2 капли
NaOH	Титровать до слабо-розовой окраски, не исчезающей 30 сек.		

Результаты титрования фиксируют следующим образом:

V_k – количество щелочи (мл), пошедшее на титрование контрольной пробы (исходнок количество свободных кислот);

V_1 – количество щелочи, пошедшее на титрование первой опытной пробы (без желчи);

V_2 – количество щелочи, пошедшее на титрование второй опытной пробы (с желчью).

Расчет:

1. Количество жирных кислот, образованных при гидролизе без желчи:

$$X_1 = V_1 - V_k$$

2. Количество жирных кислот, образованных при гидролизе в присутствии желчи:

$$X_2 = V_2 - V_k$$

3. Рассчитать прирост активности липаз в присутствии желчи:

$$\% = X_2 \backslash X_1 * 100$$

Задание:

Сделать вывод о роли желчных кислот для гидролиза липидных компонентов пищи. Обсудить строение, свойства и образование желчных кислот в печени.

ТЕМА 8.3. ПРОМЕЖУТОЧНЫЙ ОБМЕН ЛИПИДОВ

Актуальность

О состоянии липидного обмена в организме судят, определяя содержание нейтральных липидов, холестерина и его фракций. Особое значение имеет определение транспортных форм различных липидов (атерогенных и антиатерогенных липопротеинов).

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 1

Количественного определения общих липидов в сыворотке крови

Понятие «общие липиды» объединяет в себе сумму всех липидов, содержащихся в плазме крови или других тканях.

Для количественного определения общих липидов крови используются следующие методы:

1. Окислительные методы, в которых используется окисление липидов бихроматом калия или хромовой кислотой с последующим титрометрическим или колориметрическим исследованием.
2. Методы, основанные на свойстве липидов окрашиваться суданом черным. Эти методы удобны, просты, но отличаются плохой воспроизводимостью.
3. Колориметрические методы. Наиболее распространенным является метод с использованием сульфованилинового реактива.

Определение концентрации общих липидов в сыворотке крови сульфованилиновым методом

Принцип

Ненасыщенные компоненты липидов при нагревании реагируют с серной кислотой с образованием карбониевого аниона; фосфорная кислота этерифицирует ОН-группу ванилина. Карбониевый анион взаимодействует с активированной карбонильной группой фосфата ванилина, образуя стабильный окрашенный комплекс.

Реактивы

- 1) H_2SO_4 ч.д.а.;
- 2) фосфорно-ванилиновая смесь: концентрированную H_3PO_4 11,5 моль/л смешивают с 0,6% раствором ванилина 10 ммоль/л в соотношении 4:1;
- 3) стандартный раствор: 8 г/л общих липидов.

Ход анализа

Отмерить, мл	Опыт, мл	Стандарт, мл	Слепая проба, мл
Сыворотка крови	0,02	-	-
Стандартный р-р липидов, 8 г/л	-	0,02	-
Серная кислота	1,5	1,5	1,5
	Нагревают 15 мин на кипящей водяной бане. В новые пробирки отбирают по 0,1 мл гидролизата из проинкубированных смесей и добавляют.		
Фосфорнованилиновая смесь	1,5	1,5	1,5
	Выдерживают 50 мин при комнатной температуре. Колориметрируют пробы и стандарт при длине волны 510–550 нм, против слепой пробы.		

Расчет:

$$\text{Концентрация общих липидов, С г/л} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}},$$

где: $E_{\text{оп}}$ и $E_{\text{ст}}$ – экстинкции опыта и стандарта; $C_{\text{ст}}$ – концентрация общих липидов в стандартном растворе – 8 г/л.

Концентрация общих липидов в сыворотке крови человека в норме:

$$4,0 - 8,0 \text{ г/л}$$

Оформление работы

Отмечают принцип метода определения общих липидов и результаты проведения анализа. Делают вывод о возможных патологиях.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 2 **Определение содержания холестерина** **в тканях животных**

Холестерол является важнейшим липидным компонентом клеточных мембран животных тканей, где он содержится как в виде свободного холестерина, так и в виде эфиров с высшими жирными кислотами, главным образом, линолевой и олеиновой. Особо богаты холестерином мембраны клеток нервной ткани.

Выделение холестерина

Принцип

Метод основан на разрушении мембран путем обработки органических растворителями (например, хлороформом) с последующим экстрагированием холестерина этими растворителями.

Реактивы и оборудование

- 1) гипс (CaSO_4);
- 2) хлороформ;
- 3) весы, разновесы, предметные стекла, спиртовка, фотоэлектроколориметр.

Ход работы

500 мг образца (мозг, печень крысы) растирают в ступке с порошком CaSO_4 до получения густой кашицы.

При помощи скальпеля или стеклянной палочки распределяют кашицу тонким слоем на стекле и высушивают, держа высоко над пламенем спиртовки (температура не должна превышать $+60^\circ\text{C}$).

Высушенный с гипсом материал соскабливают в сухую центрифужную пробирку и заливают 5 мл хлороформа.

Экстрагируют холестеролС при комнатной температуре в течение 5 мин, затем смесь центрифугируют и измеряют объем надосадочной жидкости – экстракта.

Хлороформный экстракт холестерина выпаривают на водяной бане досуха, затем приливают рабочий реагент для ферментативного определения холестерина. Содержание холестерина выражают в расчете на 1 г ткани.

Параллельно определяют количество холестерина в сыворотке крови.

Количественное определение холестерина

Для определения содержания холестерина в крови используют ферментативный метод. В основе метода лежит ферментативный гидролиз эфиров холестерина холестеролэстеразой, окисление холестерина холестеролоксидазой в присутствии кислорода воздуха с образованием холестенола и ФАДН_2 . Реокисление ФАДН_2 приводит к образованию перекиси водорода. Пероксидаза разрушает перекись, изменение концентрации перекиси регистрируется по окраске индикатора (4-аминоантипирин).

Пробы перемешивают, инкубируют 10 мин при $+37^\circ\text{C}$. Оптическую плотность пробы и калибратора измеряют при длине волны 500 нм против рабочего реагента.

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

где: $E_{\text{оп}}$ и $E_{\text{ст}}$ – оптические плотности опыта и стандарта (калибратора); $C_{\text{ст}}$ – концентрация холестерина в стандартном растворе (калибраторе).

Ход определения холестерина ферментативным методом

Отмерить, мкл	Опытная проба	Калибровочная проба
Рабочий реагент: фосфатный буфер, ферменты и индикатор 4-аминоанти-пирин	1000	1000
Проба: сыворотка крови	10	-
Калибратор: раствор холестерол 4.65 ммоль/л	-	10

Концентрация холестерина в сыворотке крови человека в норме:

Сыворотка		
	0–1 год	1,81–4,53 ммоль/л
	до 20 лет	3,10–5,80 ммоль/л
	старше 20 лет	3,40–7,40 ммоль/л

Примечание: колориметрический метод Илька (по реакции Либермана–Бурхарда), как малоспецифичный и малочувствительный, в настоящее время не применяется.

Оформление работы

Отмечают принцип методов выделения и определения холестерина и результаты проведения анализа. Делают вывод о возможных патологиях.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 3

Определение содержания холестерина в составе липопротеинов различных классов

Липопротеины – частицы, являющиеся транспортными формами экзогенных и эндогенных липидов по кровяному руслу. Липопротеины являются мицеллярными структурами, образующие комплексы со специфическими белками – апопротеинами, благодаря которым эти липид-содержащие частицы становятся растворимы в водной среде организма. Липопротеины делят на 4 основных класса, представители которых различаются по размеру, плавучей плотности (удельному весу), процентному содержанию отдельных

классов липидов и по соотношению липиды/белки (апопротеины). Различают хиломикроны, пре-β-липопротеины (липопротеины очень низкой плотности, ЛПОНП), β-липопротеины (липопротеины низкой плотности, ЛПНП) и α-липопротеины (липопротеины высокой плотности, ЛПВП).

Относительно постоянный уровень циркулирующих в крови липопротеинов поддерживают следующие процессы:

- синтез и секреция липидных и белковых компонентов;
- активный обмен липидными компонентами между липопротеиновыми частицами различных классов;
- наличие пула свободных белков крови;
- специфический транспорт плазменных белков;
- изменения в составе липопротеинов в результате процессов, активируемых гепаринзависимой липопротеинлипазой, печеночной триацилглицероллипазой (КФ 3.1.1.3.) и фосфатидилхолинхолестеролацилтрансферазой (КФ 2.3.1.43.);
- удаление липопротеинов из циркуляции путем рецепторопосредованного эндоцитоза.

Для клинической практики важно определять соотношение содержания разных классов липопротеинов в сыворотки крови и, в первую очередь, атерогенных и антиатерогенных классов. Наиболее распространенным подходом для решения этой задачи является определение содержания холестерина в составе атерогенных классов липопротеинов (ЛПНП и ЛПОНП) и антиатерогенных липопротеинов – ЛПВП.

Принцип метода

Хиломикроны, ЛПОНП и ЛПНП осаждаются при добавлении к образцу сыворотки крови фосфорнофольфрамовой кислоты и соли магния. После центрифугирования в надосадочной жидкости остается только холестерол в составе ЛПВП, концентрацию которого определяют ферментативным методом (см. выше в настоящем Практикуме).

Ход анализа

(включая этап осаждения хиломикронов, ЛПОНП и ЛПНП)

Отмерить, мл	Опытная проба	Калибровочная проба
Осаждающий реагент	0,3	0,3
Проба: сыворотка крови	0,15	-
Калибратор: раствор холестерина с концентрацией 1,29 ммоль/л	-	0,15

Контрольная проба содержит 0,3 мл осаждающего реагента и

0,15 мл воды. Пробы тщательно перемешивают, выдерживают 10 мин при комнатной температуре и центрифугируют 10 мин при 4000g или 2 мин при 10 000g. В надосадочной жидкости определяют концентрацию холестерина в составе ЛПВП.

Рассчитывают концентрацию холестерина пропорционально экстинкции калибровочной пробы.

Концентрация холестерина в составе ЛПВП в норме:

мужчины – более 1,42 ммоль/л

женщины – более 1,68 ммоль/л

Параллельно определяют содержание общего холестерина в сыворотке крови (суммарное содержание холестерина в составе всех классов сывороточных липопротеинов). Для определения содержания холестерина в составе атерогенных классов липопротеинов (ЛПОНП + ЛПНП) необходимо из концентрации общего холестерина сыворотки вычесть концентрацию холестерина в составе ЛПВП. Эти данные позволяют рассчитать **коэффициент атерогенности**, который представляет собой отношение концентрации холестерина в составе атерогенных классов (ЛПОНП + ЛПНП) к концентрации холестерина в составе ЛПВП. Коэффициент атерогенности у практически здоровых лиц среднего возраста не должен превышать величину **3,5**.

Оформление работы

Отмечают принцип метода определения общего холестерина в сыворотке крови и в составе антиатерогенных ЛПВП, результаты проведения анализа. Делают вывод о возможных патологиях.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 4

Определение содержания триацилглицеролов в сыворотке крови

Триацилглицеролы – сложные эфиры глицерола (глицерина) и высших жирных кислот. У человека в составе триацилглицеролов в наибольшем количестве содержатся стеариновая, пальмитиновая, пальмитоолеиновая кислоты и олеиновая кислота.

Для определения концентрации триацилглицеролов в сыворотке крови наибольшее широкое применение нашли химические методы. Эти методы основаны на определении содержания глицерола, освобождающегося при гидролизе триацилглицеролов, и включают три основных этапа:

1. Тотальная экстракция липидов из биологического материала органическими растворителями (хлороформ, гептан). Выделе-

ние фракции триацилглицеролов из смеси общих липидов осуществляется их дополнительной экстракцией из смеси, обычно, изопропанолом, либо применяется адсорбент для фосфолипидов и моносахаридов (кремниевая кислота, сернокислая медь, карбонат кальция, силикагель).

2. Химический или ферментативный гидролиз экстрагированных триацилглицеролов.
3. Количественное определение образовавшегося в результате гидролиза глицерола по его реакции с ацетилацетоном и ацетатом аммония с образованием 3,5-диацетил-1,4-дигидролутидина при длине волны 412 нм (колориметрический метод).

В современной клинико-биохимической практике количественное определение триацилглицеролов в сыворотке крови проводят ферментативным методом. В его основе лежит гидролиз липопротеинов сыворотки липопротеинлипазой, фосфорилирование освобождающегося глицерола и окисление его до диоксиацетонфосфата и разложение перекиси водорода, убыль которой измеряют по степени изменившейся окраски индикатора: 4-аминоантипирина.

Ход выполнения анализа

Отмерить, мкл	Опытная проба	Калибровочная проба
Калибратор: раствор глицерола, соответствующий концентрации триацилглицерола; 2,29 ммоль/л		10
Проба: сыворотка крови	10	
Рабочий реагент: буфер, ферменты и индикатор	1000	1000

Пробы перемешивают, инкубируют 5 мин при 37 °С и измеряют оптическую плотность при длине волны 500 нм против рабочего реагента.

Расчет:

Концентрация триацилглицерола в сыворотке крови,

$$C \text{ ммоль/л} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}}$$

где: $E_{\text{оп}}$ и $E_{\text{ст}}$ – экстинкции опыта и стандарта; $C_{\text{ст}}$ – концентрация триацилглицерола в стандарте (калибраторе).

Концентрация триацилглицеролов в сыворотке крови человека в норме:

Возраст, годы	мужчины, ммоль/л	женщины, ммоль/л
0–19 лет	0,34–1,84	0,36–1,45
20–49 лет	0,50–3,37	0,45–2,10
50 лет и старше	0,70–3,35	0,62–2,79

Оформление работы

Отмечают принцип метода определения триацилглицеролов, результаты проведения анализа. Делают вывод о возможных патологиях.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Важнейшим компонентом сурфактанта — липопротеина, выстилающего альвеолы и необходимого для нормальной работы легких, является дипальмитоилфосфатидилхолин.

- A. Напишите его структурную формулу.
- B. Фосфатидилхолины, входящие в состав цитоплазматических мембран клеток, отличаются по составу жирных кислот от этого фосфатидилхолина. Укажите, в чем состоит это отличие.

2. Подберите к каждому типу липидов и их производных соответствующую функцию.

- | | |
|--------------------------|--------------------------------------------------------------|
| 1. Триацилглицерины. | A. Источники энергии, структурные компоненты других липидов. |
| 2. Жирные кислоты. | B. Запасная форма источника энергии. |
| 3. Сфингомиелины. | C. Структурный компонент мембран. |
| 4. Простагландины. | D. Регуляторы тонуса гладкой мускулатуры. |
| 5. Таурохолевая кислота. | E. Антигеморрагический фактор. |
| 6. Витамин E. | F. Эмульгатор. |
| 7. Витамин K. | G. Антиоксидант. |

3. Выберите положения, правильно характеризующие функции желчи.

- 1. Эмульгирует жиры.
- 2. Активирует липазу.
- 3. Способствует всасыванию моноацилглицеринов.
- 4. Гидролизует жиры.
- 5. Способствует всасыванию холестерина.
- 6. Способствует всасыванию витамина D.
- 7. Способствует всасыванию витамина K.

4. Один из продуктов переваривания жиров существенно ускоряет этот процесс.

- А. Какой это продукт?
- Б. Почему он ускоряет переваривание жиров?

5. Какие последствия может иметь нарушение всасывания жиров?

- 1. Стеаторея.
- 2. Гиповитаминоз Д.
- 3. Гиповитаминоз К.
- 4. Ухудшение зрения в темноте.
- 5. Гиповитаминоз РР.
- 6. Нарушение синтеза насыщенных жирных кислот.
- 7. Уменьшение содержания арахидоновой кислоты в тканях.

6. У человека, длительно не употреблявшего в пищу жиров, но получавшего достаточное количество углеводов и белков, обнаружены дерматит, плохое заживление ран, ухудшение зрения, снижена половая функция. При назначении терапевтической диеты, содержащей рыбий жир, симптомы исчезли. Выберите возможные причины нарушения обмена.

- 1. Недостаток пальмитиновой кислоты.
- 2. Недостаток олеиновой кислоты.
- 3. Недостаток линолевой кислоты.
- 4. Недостаточное поступление витаминов А, Д, Е, К.
- 5. Недостаточное поступление витаминов Н, РР.
- 6. Низкая калорийность диеты.

7. Яд некоторых змей содержит фосфолипазу A_2 . Если к цельной крови добавить небольшое количество яда, то быстро наступает гемолиз.

- 1. Напишите реакцию, которая будет происходить под действием этого компонента яда. Объясните причину гемолиза в данном случае.
- 2. Будет ли изменяться структура сфингомиелина под действием этого фермента? Почему?

8. Для каждого типа липопротеинов подберите соответствующий состав.

- | | |
|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. ЛПВП | А. \approx 90% триацилглицеролов и 2% белков
 В. \approx 50% эфиров холестерина
 С. \approx 50% белков и 20% эфиров холестерина
 Д. \approx 10% белков и 50–55% триацилглицерола |
| 2. Хиломикроны | |
| 3. ЛПНП | |
| 4. ЛПОНП | |

9. Выберите основные причины нарушения переваривания и всасывания жира.

1. Нарушение синтеза панкреатической липазы.
2. Отсутствие секреции трипсина.
3. Нарушение поступления желчи в кишечник.
4. Затруднение поступления панкреатического сока в кишечник.
5. Недостаточная секреция HCO_3^- .
6. Недостаточная секреция HCl .

10. У мальчика 6 лет наблюдается быстрая утомляемость, неспособность к выполнению физической работы. При исследовании клеток мышц, взятых путем биопсии, обнаружили большие количества триацилглицеролов. При определении их количества в клетках концентрации оказались в несколько раз больше, чем в норме, а концентрация карнитина в 5 раз меньше. Почему при данном заболевании резко снижается способность выполнять длительную физическую нагрузку?

11. У экспериментального животного определяли разницу в концентрации жирных кислот в крови, питающей интенсивно работающую скелетную мышцу, и в крови, оттекающей от этой мышцы на 1-й и 20-й минутах работы. В каком случае разница в концентрации жирных кислот будет больше?

12. При гликолизе увеличивается концентрация АТФ в клетках печени и ускоряется синтез жирных кислот. Покажите правильную последовательность событий из представленных ниже элементов схемы.

1. Увеличение концентрации АТФ в клетках печени.
2. Активация ацетил-КоА-карбоксилазы.
3. Образование малонил-КоА.
4. Образование ацетил-КоА.
5. Ингибирование изоцитратдегидрогеназы.
6. Переход цитрата в цитоплазму.
7. Действие цитратлиазы.
8. Увеличение концентрации цитрата в митохондриях.

13. Выберите утверждения, правильно характеризующие особенности обмена арахидоновой кислоты в организме.

1. Является предшественником в синтезе простагландинов.
2. Находятся в основном в β -положении молекул фосфолипидов.
3. Подвергается перекисному окислению

4. Может синтезироваться в организме из пальмитиновой кислоты.
5. Может синтезироваться в организме из линолевой кислоты.
6. Является предшественником в синтезе тромбоксанов.
7. Является предшественником в синтезе простаглицлинов.

14. Какие органы и ткани используют кетоновые тела в качестве источника энергии при голодании?

1. Мозг.
2. Скелетные мышцы.
3. Сердце.
4. Печень.
5. Кортиковый слой почек.

15. Человек голодает в течение 24 часов.

A. Какие из следующих утверждений правильно характеризуют метаболизм в этих условиях:

1. Активность ТАГ-липазы в жировой ткани увеличивается.
2. Активность протеинкиназы в клетках жировой ткани увеличивается.
3. Концентрация жирных кислот в крови повышена, увеличено их поступление в печень.
4. Активность процесса β -окисления жирных кислот в печени увеличена.
5. Скорость реакций ЦТК в клетках печени уменьшается.
6. В клетках печени повышена скорость синтеза гидроксиметилглутарил-КоА и ацетоацетата.

B. Какие вещества используются мышечной тканью в качестве источников энергии в этих условиях?

16. Человек голодает в течение 5 дней. Если сравнить состояние его обмена с нормой, то каковы будут значения следующих показателей (соответствие цифра-буква):

- | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. Концентрация глюкозы в крови. 2. Активность ТАГ-липазы в жировой ткани. 3. Скорость реакций ЦТК в печени. 4. Скорость синтеза ацетоацетата. 5. Концентрация жирных кислот в крови. 6. Активность фермента ГМГ-синтазы в печени. | <ol style="list-style-type: none"> A. Увеличивается. B. Снижается. C. Соответствует нормальному состоянию. |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

17. Рассчитайте, сколько моль глюкозы необходимо для образования 1 моля дипальмитилолеилглицерола. Расчет провести только для необходимого количества углерода при условии, что глюкоза является единственным его источником.

18. Нелактирующая молочная железа лишена липопротеинлипазы. Незадолго до родов под действием пролактина ее активность в эндотелии капилляров молочной железы резко увеличивается, а в жировой ткани снижается.

1. Как изменится метаболизм жиров в клетках молочной железы после родов.
2. Напишите реакции, иллюстрирующие Ваш ответ.

19. Приблизительно одна треть жиров, получаемых с пищей, должна быть растительного происхождения. Подтвердите это, дав ответы на следующие вопросы:

1. Назовите известные Вам незаменимые факторы питания, которые содержатся в растительных маслах.
2. Синтез каких регуляторных молекул производных липидов будет нарушен при недостатке этих факторов?
3. Какие функции выполняют в организме эти производные липидов?

20. Выберите, какие из перечисленных гормонов являются производными холестерина.

1. Эстрогены.
2. Кортикостероиды.
3. Андрогены.
4. Катехоламины.
5. Минералокортикоиды.

21. Сравните особенности образования, транспорта и превращения основной части экзогенного и эндогенного холестерина, подобрав к перечисленным утверждениям соответствующие буквенные ответы.

- | | | | | | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------|
| <ol style="list-style-type: none">1. Включается в липопротеины, образующиеся в эпителии кишечника.2. Включается в ЛПОНП, образующиеся в печени.3. В составе хиломикроннов поступает в лимфу.4. Из органа, где синтезируется, с составе липопротеинов непосредственно поступает в кровь. | <table border="0"><tr><td>A. Характерно для экзогенного холестерина.</td></tr><tr><td>B. Характерно для эндогенного холестерина.</td></tr><tr><td>C. Характерно для обоих видов холестерина.</td></tr><tr><td>D. Нехарактерно ни для одного из них.</td></tr></table> | A. Характерно для экзогенного холестерина. | B. Характерно для эндогенного холестерина. | C. Характерно для обоих видов холестерина. | D. Нехарактерно ни для одного из них. |
| A. Характерно для экзогенного холестерина. | | | | | |
| B. Характерно для эндогенного холестерина. | | | | | |
| C. Характерно для обоих видов холестерина. | | | | | |
| D. Нехарактерно ни для одного из них. | | | | | |

5. Липопротеины, содержащие холестерол, после действия на них ЛП-липазы поглощаются печенью.

22. Некоторые из применяемых в кулинарии жиров, например, сливочное масло, быстро портятся при хранении на воздухе при комнатной температуре, тогда как свойства твердых жиров типа маргарина в аналогичных условиях меняются мало. Почему?

23. В процессе приготовления майонеза фосфатидилхолин (лецитин) из яичных желтков переходит в растительное масло, что стабилизирует соус и не позволяет ему расслаиваться. Объясните, почему это происходит.

24. Липидный бислой мембраны предохраняет клетки от быстрой потери ионов калия, хлора, магния. Почему?

25. У взрослого человека, вес которого составляет 70 кг, 15% веса тела приходится на долю триацилглицеролов. Вычислите общий запас топлива (в килокалориях), содержащегося в организме в форме триацилглицеролов. Как долго мог бы прожить этот человек, если бы единственным источником энергии для его организма было окисление жирных кислот, входящих в состав триацилглицеролов? При расчете исходите из того, суточная потребность взрослого человека в энергии в состоянии покоя равна приблизительно 2000 ккал. Какой будет суточная потеря веса при голодании?

26. Вопреки распространенному мнению горб верблюда вовсе не хранит в себе запасы воды; это просто большой запас жира. Как может этот жир служить источником воды? Вычислите количество воды (в литрах), которое может образоваться в теле верблюда из 1 кг жира. Для простоты исходите из того, что весь жир представлен трипальмитином.

27. Когда при β -окислении в печени образуется больше ацетил-КоА, чем может быть окислено в ЦТК, избыток ацетил-КоА направляется на образование кетоновых тел (ацетоацетата, гидроксипутирата, ацетона). Именно такое положение существует при тяжелой форме диабета, потому что ткани таких больных не способны утилизировать глюкозу и вместо этого окисляют большие количества жирных кислот. Хотя ацетил-КоА и нетоксичен, в митохондриях его избыток все же должен переводиться в кетоновые тела. Почему? Каким образом это разрешает возникающую проблему энергетического обмена?

28. Представьте себе, что Вам пришлось бы питаться китовым и тюленьим жиром, а углеводов при этом Вы бы при этом почти или даже совсем не получали.

1. Как сказало бы это отсутствие углеводов в рационе на использовании жиров в качестве источника энергии?
2. При полном отсутствии углеводов в рационе, какие жирные кислоты выгоднее потреблять – с четным или нечетным числом атомов углерода?

29. Двуокись углерода — обязательный участник биосинтеза жирных кислот. В чем заключается специфическая роль CO_2 ? Будет ли пальмитат, образовавшийся при инкубации растворимой фракции печени с $^{14}\text{CO}_2$ и другими компонентами, необходимыми для биосинтеза жирных кислот, содержать ^{14}C ? Обоснуйте.

30. Объясните следующие экспериментальные данные:

1. Добавление равномерно меченного ^{14}C -ацетил-КоА к растворимой фракции печени приводит к образованию равномерно меченного ^{14}C -пальмитата.
2. Вместе с тем добавление к растворимой фракции печени следовых количеств равномерно меченного ^{14}C -ацетил-КоА в присутствии избытка малонил-КоА приводит к образованию пальмитата, содержащего ^{14}C только в положениях 15 и 16.

31. Растения не синтезируют холестерол, а вырабатывают другие стероиды, называемые фитостероидами. Когда больные с гиперхолестеролиемией получают с пищей β -фитостерол (один из фитостероидов), уровень холестерина в крови у них снижается, что должно уменьшить вероятность заболевания атеросклерозом. Предложите возможные механизмы действия β -фитостерола.

32. Крысе ввели препарат 3- ^{14}C -аланина. Через час после этого из печени животного экстрагировали липиды. Полученный при экстракции пальмитат содержал ^{14}C . Как это объяснить? В какой позиции молекулы пальмитата находится ^{14}C ? Может ли аланин служить предшественником в реальном синтезе пальмитата de novo?

РАЗДЕЛ 9

ВЗАИМОСВЯЗЬ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ. ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТАБОЛИЗМА КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ. ЭТАПЫ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА

Вопросы к семинару

1. Характеристика обмена веществ в клетках млекопитающих: гетеротрофы, хемотротрофы, факультативные аэробы. Источники углерода и азота.
2. Запасы метаболического топлива в организме.
3. Этапы энергетического обмена. Унификация «клеточного топлива».
4. Источники НАДН, НАДФН, ФАДН₂. Роль восстановленных эквивалентов в обмене веществ.
5. Взаимосвязь углеводного и липидного метаболизма. Глицерол. Триозы. Кетогенез. Роль пентозофосфатного шунта окисления глюкозы.
6. Взаимосвязь углеводного и белкового метаболизма. Трансаминирование. Глюкогенные и кетогенные аминокислоты. Продукты распада аминокислот в организме.
7. Взаимосвязь липидного и белкового метаболизма. Роль серина и метионина в биосинтезе фосфолипидов.
8. Конечные продукты обмена, принадлежащие одновременно углеводам, белкам и липидам.
9. Роль нуклеотидов в различных видах обмена.

РАЗДЕЛ 10

БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ И ТКАНЕВОЕ ДЫХАНИЕ

Вопросы к семинару

1. Типы биологического окисления. Тканевое дыхание.
2. Стадии катаболизма белков, углеводов, липидов. Специфические и универсальные пути катаболизма. Ключевые метаболиты (пируват, ацетил-S-CoA).
3. Пути синтеза АТФ в клетках. Локализация процессов, реакции и условия синтеза. Сходство и различия.
4. Механизмы реакций субстратного фосфорилирования в гликолитическом пути и цикле трикарбоновых кислот.
5. Роль восстановленных эквивалентов в переносе водорода в дыхательную цепь. НАДН- и ФАДН-зависимые дегидрогеназы, примеры. Механизмы окислительно-восстановительных реакций.
6. Челночные механизмы доставки восстановленных эквивалентов из цитозоля в митохондрии.
7. Гипотезы сопряжения дыхания и фосфорилирования (химическая, конформационная, хемиосмотическая).
8. Хемиосмотическая гипотеза сопряжения дыхания и фосфорилирования П. Митчелла.
9. Структура дыхательной цепи митохондрий. Комплексы ферментов, транспортирующих H^+ и электронов. Фактор сопряжения дыхания и фосфорилирования. Пункты фосфорилирования.
10. Структура и функция АТФ-синтетазы (субъединичный состав, трансмембранная ориентация, обратимость реакции. Дыхательный контроль. Адениннуклеотидтранслоказа, фосфаттранслоказа.
11. Ингибиторы дыхания. Разобщители-ионофоры. Природные разобщители. Термогенез.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Какие из следующих утверждений правильно описывают механизм окислительного фосфорилирования?
 - А. Функцией цепи переноса электронов (ЦПЭ) является перенос протонов через внутреннюю мембрану в митохондриальный матрикс.
 - В. Энергия электронов, переносимых по ЦПЭ, трансформиру-

ется в энергию электрохимического градиента.

- C. Однонаправленный транспорт H^+ в межмембранное пространство создает градиент рН.
- D. Протонофоры разобщают тканевое дыхание и фосфорилирование.
- E. АТФаза осуществляет транспорт H^+ в межмембранное пространство.
- F. Энергия электрохимического градиента используется для синтеза АТФ.

2. В эксперименте с изолированными митохондриями в качестве окисляемого субстрата использовали малат. Как изменится коэффициент P/O, если

- A. В инкубационную среду добавить ингибитор НАДН-дегидрогеназы?
- B. Вместе с ингибитором добавить сукцинат?
- C. Вместе с ингибитором добавить донор электронов, восстанавливающий цитохром c?

3. Выберите, какие из перечисленных соединений могут снизить скорость тканевого дыхания при добавлении их в инкубационную смесь:

- | | |
|-----------|------------|
| 1. Цитрат | 4. KCN |
| 2. HS~КоА | 5. Ротенон |
| 3. НАДН | 6. Малат |

4. Подберите к каждому соединению, выбранному в предыдущем упражнении, соответствующий механизм действия.

- A. Ингибирование ферментов ЦПЭ.
- B. Необратимое ингибирование цитохромоксидазы.
- C. Ингибирование НАДН-дегидрогеназы.
- D. Аллостерическое ингибирование ферментов ПДК.
- E. Разобщение дыхания и фосфорилирования.

5. В опыте *in vitro* изучали тканевое дыхание на препаратах изолированных митохондрий, наблюдая за тем, как изменится поглощение кислорода этими препаратами в зависимости от условий. Если к суспензии митохондрий, использующих в качестве единственного источника «топлива» пируват, добавить 0,01 М малоната натрия, то дыхание резко снижается и накапливается один из промежуточных продуктов метаболизма.

- A. Какова структура накапливающегося промежуточного продукта?
- B. Почему он накапливается?
- C. Почему прекращается потребление кислорода?

6. Выберите утверждения, которые правильно отражают особенности регуляции реакций общего пути катаболизма.

- A. Исоцитратдегидрогеназа является аллостерическим ферментом.
- B. Цитрат лимитирует аэробное окисление глюкозы.
- C. Активность пируватдегидрогеназного комплекса не зависит от концентрации цитрата.
- D. Скорость цитратного цикла не зависит от отношения $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$.
- E. Ингибиторы ферментов ЦПЭ снижают скорость реакций цитратного цикла.
- F. Разобщители дыхания и фосфорилирования не влияют на скорость реакций общего пути катаболизма.

7. Подберите к перечисленным регуляторным ферментам общего пути катаболизма соответствующие модуляторы (эфффекторы).

- | | |
|---------------------------------------------------|-------------------------------|
| 1. Пируватдегидрогеназный комплекс. | A. Активируется цитратом. |
| 2. Цитратсинтаза. | B. Ингибируется ацетил-КоА. |
| 3. Исоцитратдегидрогеназа. | C. Ингибируется АТФ. |
| 4. α -Кетоглутаратдегидрогеназный комплекс | D. Ингибируется сукцинил-КоА. |

8. В эксперименте с изолированными митохондриями в качестве окисляемого субстрата использовали исоцитрат.

A. В присутствии каких из перечисленных веществ будет тормозиться окисление исоцитрата?

- 1. Амитал натрия.
- 2. Ротенон.
- 3. АДФ
- 4. 2,4-динитрофенол.

B. Как изменится скорость поглощения кислорода, если в условиях ингибирования исоцитратдегидрогеназы к митохондриям добавить донор электронов, восстанавливающий аскорбиновую кислоту?

B. Чему будет равен коэффициент P/O?

9. В эксперименте на дышащих митохондриях в 2 пробы, содержащие по 1 мл суспензии митохондрий, добавили одинаковое количество малата и АДФ; в одну из проб внесли еще дополнительно глюкозу и гексокиназу. В какой из проб скорость поглощения кислорода будет выше и почему?

10. 2,4-динитрофенол, который является разобщающим агентом, пытались использовать для борьбы с ожирением.

A. На чем основывался этот выбор?

- Б. В настоящее время подобные вещества уже не применяются в качестве лекарственных препаратов, так как известны случаи, когда их применение приводило к летальному исходу. Почему прием таких препаратов может привести к гибели?

11. При изучении тканевого дыхания Кребс использовал препарат мышцы, отравленной малонатом. Он установил следующее:

1. Малонат снижает скорость окисления ацетил-КоА и приводит к накоплению в среде сукцината.
2. Накопление сукцината происходит в при добавлении к мышцам последовательно цитрата, α -кетоглутарата, фумарата, оксалоацетата.
3. В отсутствие малоната одна молекула оксалоацетата участвует в окислении многих молекул ацетил-КоА.

12. Представьте в виде схемы последовательность реакций цитратного цикла и объясните, какие результаты опытов подтверждали гипотезу Кребса о циклическом характере реакций, осуществляющих окисление ацетил-КоА.

13. Выберите положения, которые правильно характеризуют «микросомальное» окисление.

1. «Микросомальное» окисление происходит в гладком эндоплазматическом ретикулуме печени и других органов, а также в митохондриях коры надпочечников и половых желез.
2. НАДН является донором водорода для реакций «микросомального» окисления.
3. Главные ферменты системы – цитохром P450 и НАДФ: цитохром P450-редуктаза.
4. Для образования гидроксильной группы в модифицируемом гидрофобном веществе используется атом кислорода молекулы воды.
5. Цитохром P450 (атом железа гема) переносит электроны на атом кислорода с образованием молекулы воды.

14. Выберите правильные утверждения:

1. Активные формы кислорода (супероксидный анион-радикал, пероксид водорода, гидроксильный радикал) могут образовываться в результате последовательного одно-электронного восстановления молекулярного кислорода в ферментативных и неферментативных реакциях в клетке.
2. Активные формы кислорода инициируют свободноради-

кальные процессы в организме, реагируют с нуклеиновыми кислотами, липидами, белками и могут вызывать их повреждение.

3. Витамин Е является важнейшим компонентом системы неферментативной антиоксидантной защиты клетки.
4. Бактерицидное действие фагоцитов обусловлено активацией ферментов антиоксидантной защиты.

15. Стандартный восстановительный потенциал любой окислительно-восстановительной пары определяется реакцией, протекающей в полуэлементе:

Окислитель + (*n*)Электроны = Восстановитель. Стандартные восстановительные потенциалы двух сопряженных пар НАД⁺/НАДН и пируват/лактат равны соответственно –0,32 и –0,19 В.

- A. Какая из этих пар обладает большей способностью отдавать электроны?
- B. Какая из них является более сильным окислителем?
- C. В каком направлении пойдет реакция:
$$\text{Пируват} + \text{НАДН} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Лактат} + \text{НАД}^+$$
если в начальный момент времени концентрация исходных веществ и продуктов равны 1 М при рН 7,0?
- D. Чему равно изменение стандартной свободной энергии ΔG° для этой реакции при 25 °С?
- E. Чему равна константа равновесия этой реакции при 25 °С?

16. Если к суспензии активно дышащих митохондрий, в которых дыхание тесно сопряжено с фосфорилированием, добавить дициклогексилкарбодиимид (ДЦКД), то наблюдается резкое уменьшение скорости переноса электронов (оцениваемой по количеству поглощенного кислорода) и скорости фосфорилирования (оцениваемой по образованию АТФ). Добавив затем к таким ингибированным митохондриальным препаратам 2.4-динитрофенол, мы обнаружим, что потребление кислорода возвращается к нормальному уровню, однако синтез АТФ так и остается подавленным.

1. На какой этап переноса электронов или окислительного фосфорилирования влияет ДЦКД?
2. Почему ДЦКД нарушает потребление кислорода в митохондриях?
3. С каким из перечисленных ниже ингибиторов более всего сходен по своему действию ДЦКД-антимидин А, ротенон, олигомицин, арсенат.

17. Во внутренней митохондриальной мембране имеется дикарбоксилатная транспортная система, которая обеспечивает перенос

через мембрану малата и α -кетоглутарата. Эта транспортная система ингибируется *n*-бутилмалонатом. Предположим, что *n*-бутилмалонат добавлен к суспензии аэробных почечных клеток, использующих в качестве топлива одну только глюкозу. Как должен подействовать *n*-бутилмалонат на а) гликолиз, б) потребление кислорода, в) образование лактата, г) синтез АТФ.

18. Если в суспензию анаэробных клеток, потребляющих глюкозу с большой скоростью, ввести кислород, то клетки начнут его поглощать и уровень потребления глюкозы резко понизится. Одновременно с этим прекратится накопление лактата. Этот эффект, характерный для клеток, способных и к аэробному, и к анаэробному потреблению глюкозы, впервые наблюдал Луи Пастер в 60-х годах прошлого века, и потому был назван эффектом Пастера.

1. Почему при введении в клеточную суспензию кислорода прекращается накопление лактата?
2. Почему в присутствии кислорода снижается скорость потребления глюкозы?
3. Каким образом после начавшегося потребления кислорода понижается скорость потребления глюкозы?

РАЗДЕЛ 11

БИОХИМИЯ МОЧИ

Актуальность

Моча представляет собой водный раствор конечных продуктов обмена веществ, выделяемых организмом. С мочой выводится около 150 различных веществ как неорганической природы (хлориды, фосфаты, сульфаты, аммонийные соли), так и органического происхождения (мочевина, мочева кислота, креатинин, индикан).

Суточное количество мочи может колебаться в широких пределах, что зависит от ряда условий, главным образом от питьевого режима. Определение суточного количества мочи (диуреза) позволяет судить о функциях почек и сердечно-сосудистой системы.

При развитии патологического процесса в организме происходит изменение не только количественного, но и качественного состава мочи, а также в некоторых случаях появляются веществ, которые в норме в моче не встречаются.

Исследование биохимического состава мочи имеет важное значение в диагностике и контроле за лечением хирургических, терапевтических, инфекционных, нервных и других заболеваний, а также при решении вопросов питания.

Для правильной трактовки результатов исследования необходимо четко представлять метаболизм определяемых в моче и плазме крови веществ: где образуются мочевины, мочева кислота, креатинин и каким образом они «ведут себя» в почках (фильтруются, секретируются, реабсорбируются).

Цель

Изучить физико-химических свойств мочи в четырех исследуемых образцах и провести определение патологических компонентов мочи.

Необходимо знать:

1. Состав мочи, органические и неорганические вещества.
2. Конечные продукты обмена белков в моче.
3. Конечные продукты обмена нуклеиновых кислот.
4. Продукты обезвреживания токсических соединений в моче.
5. Взаимосвязь количества и относительной плотности мочи.
6. Охарактеризовать связь цвета мочи и вида патологии.
7. Патологические компоненты мочи.
8. Качественный и количественный состав мочи при следующих заболеваниях: сахарном диабете, пиелонефрите, гломеруло-

нефрите, гемолитической анемии, паренхиматозной, обтурационной желтухе, воспалении мочевыводящих путей.

Необходимо уметь:

1. Проводить полуколичественные реакции на нормальные и патологические компоненты мочи с использованием тест – полосок (экспресс – определение для скрининговых исследований) или мочевого анализатора.
2. Предположить какой вид обмена (белковый, углеводный или жировой) нарушен при конкретном заболевании.

Вопросы для самоподготовки:

1. Охарактеризуйте этапы образования мочи.
2. Какая часть крови подвергается ультрафильтрации?
3. Какие компоненты первичной мочи подвергаются обратному всасыванию?
4. Особенности энергетического обмена почек.
5. Какие биологически активные вещества продуцирует ткань почек?
6. Назовите гормоны, для которых почка орган-мишень?
7. Как оценивается прозрачность мочи, о чем свидетельствует появление мутности?
8. О чем свидетельствует изменение окраски мочи?
9. О чем свидетельствует и как оценивается реакция моча (pH)?
10. Суточный диурез, удельный вес мочи и их связь.
11. Назовите конечные продукты обмена белка в моче.
12. Назовите конечные продукты обмена нуклеиновых кислот в моче.
13. Концентрация каких компонентов мочи измениться при ускоренном распаде белков?
14. Как отличить гематурию от гемоглобинурии?
15. Появление какого продукта в моче свидетельствует о нарушении проницаемости почечного барьера?
16. В каких случаях в моче появляется глюкоза, фруктоза, пентозы?
17. Проанализируйте связь между появлением в моче патологических компонентов того или иного вида обмена.

ТЕМА 11.1. НОРМАЛЬНЫЕ И ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ КОМПОНЕНТЫ МОЧИ

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Определение физико-химических свойств мочи

Анализ рекомендуется проводить по следующей схеме

1. Цвет, прозрачность, относительная плотность, pH мочи.
2. Количественное определение креатинина, мочевой кислоты,

- белка, мочевой кислоты.
3. Качественные реакции на белок, глюкозу.
 4. При обнаружении белка или глюкозы в моче, провести количественное определение.
 5. Качественные реакции на кетоновые тела, индикан.

Цвет

В норме моча прозрачна и имеет светло-желтый цвет. У детей на 2–3 день жизни моча янтарно-коричневого цвета и мутная, но через неделю моча становится прозрачной и имеет светло-желтый цвет. Нормальная окраска мочи обусловлена наличием в ней определенных пигментов.

При потреблении природных красителей, содержащихся в свекле, смородине и чернике, моча приобретает красную окраску, а при избыточном поступлении витаминов в организм моча становится ярко лимонной.

При развитии патологического процесса в организме цвет мочи может меняться, что связано с увеличением концентрации в ней тех или иных веществ.

Изменение цвета мочи при различных патологических состояниях

ЦВЕТ	ПРИЧИНА
Красный, бурый, темно-желтый	Примесь крови, а также после приема лекарств (амидопирин, сульфаниламидов)
Оранжевый	Наличие уратов
Розовый	Прием аспирина
Коричневый, бурый, зеленый	Примесь желчных пигментов (пена при встряхивании мочи окрашена в желтый цвет)
Черный	Меланома (гемоглобинурия)
Зеленовато-бурый	Паренхиматозная желтуха
Зелено-желтая	Механическая желтуха
Молочно-белый	Липурия, гнойная моча
Сине-зеленый	Присутствие индикана (язвенная болезнь, плеврит, гангрена легкого)
Бледно-окрашенная, бесцветная	Диабет, пиелонефрит, почечная недостаточность

Прозрачность

В норме, как было отмечено выше, моча представляет собой прозрачную жидкость. Помутнение мочи наблюдается при наличии солей, слизи, липидов, бактерий и форменных элементов крови. У практически здоровых лиц моча может обладать опалесценцией, причина которой – приема жирной пищи. Липурия проявляется также при сахарном диабете, переломе трубчатых костей, при отравлении фосфором и травме почек.

Реакция мочи (pH)

В норме моча имеет слабокислую или нейтральную реакцию: значение pH лежит в диапазоне 5,0–7,0. У здоровых новорожденных pH мочи находится в пределах 5,4–5,9. У недоношенных детей pH мочи составляет 4,8–5,4. Сдвиг pH в щелочную сторону (алкурия) наблюдается при употреблении растительной пищи, соды, при повышенной кислотности желудка, рвоте, цистите, гипервентиляции легких. Кислое значение pH наблюдается при сахарном диабете, недостаточности почек, почечно-каменной болезни, гипокалиемии, гипохлоремии, при избыточном употреблении мясной пищи, у детей при экссудативном диатезе. Определение реакции мочи (pH) проводят с применением универсальной индикаторной бумаги. Поместив каплю мочи на полоску индикаторной бумаги, сравнивают развившуюся окраску с прилагаемой цветной шкалой, по которой находят значение pH исследуемой мочи.

Количество мочи

Оценка количества выделенной мочи (**диурез**) используется как показатель выделительной функции почек. В норме **суточный диурез** составляет 1–2 литра (примерно 50–80% от потреблённого человеком объёма жидкости во всех её формах за день).

Олигоурия, т. е. уменьшение количества мочи до 600 мл в сутки наблюдается при отеках, недостатке воды, лихорадке, токсикозе, рвоте, диарее, острой недостаточности почек и гломерулонефрите.

Анурия (отсутствие мочи) наблюдается при резком обезвоживании организма, острой недостаточности почек, менингите, вульвите, отравлении солями ртути, свинца, мышьяка, тетании, перитоните, закупорке мочевыводящих путей камнем или сдавлении мочеточника опухолью.

У новорожденных в первые сутки наблюдается **физиологическая анурия**.

Полиурия, т. е. выделение мочи более 2 литров в сутки проявляется при избыточном потреблении воды, при выздоровлении после заболеваний, сопровождающихся лихорадкой, при схождении отеков, нефросклерозе, сахарном и несахарном диабетах.

У детей приступообразное выделение больших количеств мочи наблюдается при нервном и психическом возбуждении.

В норме соотношение дневного и ночного выделения мочи (дневного и ночного диуреза) равно 3:1–4:1. Увеличение количества мочи, выделенной за ночь (никтурия) может свидетельствовать о начальной стадии декомпенсации деятельности сердца, нефросклерозе и пиелоцистите.

Относительная плотность мочи (удельный вес)

В норме моча имеет относительную плотность (удельный вес) в

диапазоне: 1,004–1,028 г/см³.

Относительная плотность (удельный вес) мочи зависит от содержания белка и глюкозы. Наличие 10 г/л глюкозы повышает плотность мочи на 0,004 г/см³, а присутствие белка в концентрации 3 г/л – на 0,001 г/см³. Плотность мочи прямо пропорциональна интенсивности её окраски и обратно пропорциональна изменению количества суточной мочи (суточному диурезу). Высокая плотность наблюдается при олигоурии (исключение составляет полиурия при сахарном диабете, когда выделяется много светлой мочи с высокой плотностью). Низкая плотность мочи свидетельствует о схождении отеков, обильном приеме пищи, алиментарной дистрофии, несахарном диабете и повреждении канальцев почек.

Концентрирующую функцию почек оценивают по изменению относительной плотности мочи в течение суток (проба Зимницкого). Больной собирает мочу через каждые 3 часа в течение суток, т. е. получается 8 проб. В каждой пробе оценивают относительную плотность мочи. Суточный диурез составляет 50–80% от потребленной в течение дня жидкости в любой форме. Дневной диурез составляет 2/3 суточного, а ночной диурез – 1/3. В 8 собранных пробах в норме отмечается значительные колебания количества мочи (от 50 до 400 мл) и относительной плотности (от 1,003 до 1,028 г/см³). Чем разнообразнее данные по количеству и плотности мочи, тем выше функциональная способность почек пациента. Если максимальная относительная плотность мочи превышает значения 1,020 г/см³, то это является показателем хорошей концентрационной способности почек.

Измерение плотности мочи

Проведение анализа

В цилиндр вместимостью 100 мл наливают около 50 мл мочи и аккуратно опускают в него сухой и чистый урометр. Когда урометр установится, не прилипая к стенкам цилиндра, производят отсчет плотности мочи по нижнему мениску. Различные урометры откалиброваны для определенной указанной на нем температуры. Если определение производят при иной температуре, то вносят поправку: на каждые 3 °С выше указанной температуры к показаниям урометра прибавляют по 0,001 г/см³, на каждые 3 °С ниже – вычитают по 0,001 г/см³.

Оформление работы

Отмечают принцип методов, результаты проведения анализа. Делают вывод о возможных патологиях.

Геморенальные пробы

Высокое диагностическое значение имеет определение у одного и того же больного концентрации креатинина (или мочевины) в крови и моче, что позволяет получить информацию об основных функциях нефрона – фильтрации, реабсорбции, секреции, а также почечного кровообращения. Эти методы получили название геморенальных проб.

Характеристикой очистительной способности почек является условный показатель – **клиренс**:

$$C = \frac{U}{P} \cdot Y$$

где: С – коэффициент очищения (клиренс); U и P – концентрации вещества, соответственно, в моче и плазме, ммоль/л; Y – минутный диурез, мл/мин.

Клиренс показывает, какой объем плазмы полностью очищается от этого вещества за одну минуту, или тот объем плазмы, который содержит количество вещества, выделяемого почками за 1 мин.

Концентрационным индексом называется величина, показывающая во сколько раз концентрируется данное вещество в почках:

$$K = \frac{U}{P}$$

Если принять, что фильтруемое вещество не абсорбируется и не секретировается, а сгущение мочи происходит только за счет абсорбции воды, то величина фильтрации определяется по формуле:

$$F = \frac{U}{P} \cdot Y$$

По разности между объемами профильтровавшейся в одну минуту жидкости и выделенной за это же время мочи, вычисляют объем реабсорбированной воды и выражают в % к фильтрации.

Проба Реберга

1. Обследуемый выпивает натощак 400–500 мл воды или слабого чая.
2. После мочеиспускания отмечают точное время и мочу выливают;
3. Через час собирают мочу полностью и определяют минутный диурез.
4. В середине этого часа берут 5–8 мл крови из вены.
5. В крови и моче определяют концентрацию креатинина.
6. Рассчитывают величину фильтрации и реабсорбции по соответствующим формулам.

Нормальные величины:	
Клубочковая фильтрация	80–120 мл/мин
Реабсорбция	97–99 %

Оформление работы:

Отмечают принцип метода, результаты проведения анализа. Делают вывод о возможных патологиях.

1. Полуколичественный анализ мочи

Анализатор мочи **DocUReader** позволяет определять 11 показателей мочи с использованием тест-полосок LabStripU11Plus.

Тест-полоска погружается в пробирку с образцом мочи. Излишки образца мочи удаляют, промокнув край полоски о фильтровальную бумагу.

Полоску помещают в каретку прибора тестовыми зонами вверх (не позже 50 сек после погружения в пробу!). Это время отражается на верхней панели анализатора индикаторами зеленого цвета каждые 5 сек и последние три – индикаторами красного цвета, которые предупреждают о том, что время инкубации заканчивается.

Прибор измеряет каждое поле полоски последовательно, после чего выводит каретку с полоской обратно и распечатывает результаты на принтере. Зеленая индикация соответствует норме, красная означает патологические значения.

Принципы определения и клиническая трактовка результатов

Билирубин. Образует комплекс с солями диазония в сильно-кислой среде. Интенсивность желто-коричневого окрашивания соответствует концентрации билирубина.

Определение билирубина и его конъюгатов в моче для диагностики контроля эффективности лечения заболеваний гепатобилиарной системы.

Уробилиноген. Взаимодействие уробилиногена со стабилизированными солями диазония дает окрашивание от розового до красного.

Этот продукт деградации гемоглобина используется для диагностики заболеваний печени и гемолитических расстройств.

Кетоны. Ацетоуксусная кислота и ацетон реагируют с нитропруссидом натрия в щелочном буфере, давая фиолетовое окрашивание. Используется в диагностике ацидозов или кетозов и для мониторинга состояния пациентов с диабетом.

Аскорбиновая кислота. Определение основано на обесцвечивании реагента Тельмана. Аскорбиновая кислота меняет окраску тестового поля от серо-голубого до оранжевого.

Предназначена для определения обеспеченности организма витамином С.

Глюкоза. Тест основан на двойной ферментативной реакции (глюкозооксидаза и пероксидаза). Образующаяся перекись меняет окраску индикатора от зеленого до голубого цвета.

Определяется уровень глюкозурии для диагностики состояния больных диабетом.

Содержание глюкозы в моче зависит от ее концентрации в крови, хотя выделяется она как при нормальном, так и при повышенном уровне сахара крови. При повышении концентрации глюкозы в крови преодолевается так называемый почечный порог (у здоровых людей лежит в области 8,3–9,9 ммоль/л) и наступает глюкозурия. При артериосклеротической почке, при диабете порог повышается и может не отмечаться глюкозурия даже при повышении концентрации глюкозы до 11,0–12,1 ммоль/л.

Белок (альбумин). В забуференном поле желтый индикатор становится зеленым в присутствии альбумина.

Важен для диагностики протеинурии, как патологического состояния почек (гломерулонефрит, например).

Кровь. Забуференное поле содержит пероксидазу и хромоген. Псевдопероксидазная активность гемоглобина и миоглобина дает зеленую окраску хромогена.

Скрытая кровь в моче означает урологическую или нефрологическую патологию.

pH. Двойной индикатор этого поля дает изменения в диапазоне 5,0–9,0 (оранжевый, желтый, зеленый, бирюзовый).

Используется для оценки кислотно-щелочной среды, зависящей от почечных, метаболических расстройств и диеты пациента.

Нитриты. Результаты теста зависят от присутствия Грамм+ бактерий в моче. Нитриты мочи взаимодействуют и диазотируют амин. Любая степень розовой окраски свидетельствует о присутствии более чем 10^5 микроорганизмов в мл мочи.

Используется для диагностики бактериальных инфекций мочевого тракта.

Лейкоциты. Тест основан на эстеразной активности гранулоцитов. Тестовое поле содержит эфир индоксила и соли диазония. Эстераза гранулоцитов расщепляет эфир, свободный индоксил реагирует с солями диазония, давая фиолетовое окрашивание.

Удельная плотность. Тест определяет относительную плотность мочи от 1,000 до 1,030. Основан на присутствии ионов, меняющих окраску с оранжевой до желто-коричневой.

Оценивает способность почек концентрировать мочу. Удельный вес мочи зависит от питьевого режима или свидетельствует о нарушении функции почек.

2. Полуколичественное определение белка в моче

Для исследования используется свежая, хорошо перемешанная и нецентрифугированная моча без консервантов, отобранная в чистую посуду. Нельзя исследовать мочу, стоявшую более 4 часов.

Определение с использованием индикаторной бумаги «Альбуфан»

Полоску индикаторной бумаги опускают на 1–2 сек в исследуемую мочу так, чтобы все зоны были смочены. Капли мочи удаляют, проведя полоской по краю сосуда с мочой. Полоску оставляют в горизонтальном положении. Примерно через 60 сек сопоставляют окраску зон индикации с соответствующей зоной на цветной шкале. Нельзя прикасаться руками к зонам индикации полосок!

Метод Брандерберга–Робертса–Стольникова

В 5 пробирок наливают по 2 мл дистиллированной воды. В первую пробирку добавляют 2 мл разведенной в 10 раз мочи (разведение 1:20) и 2 мл смеси переносят во вторую пробирку и таким образом готовят 5 разведений мочи, в 20, 40, 80, 160, 320 раз (из последней пробирке 2 мл смеси выливают). Затем в 5 чистых пробирок наливают по 3 мл концентрированной азотной кислоты и наслаивают мочу, разведенную в 20 и т. д. раз. Отмечают, при каком разведении появляется едва заметное белое кольцо между 2-й и 3-й минутой. Результаты анализа выражают в граммах белка на 1000 мл мочи. Для этого найденное разведение мочи умножают на 0,033.

Биуретовый метод

К 2 мл мочи добавляют 2 мл 10% раствора ТХУ и центрифугируют. К полученному осадку добавляют 4 мл 3% раствора NaOH и 0,1 мл 20% раствора CuSO_4 и центрифугируют. Надосадок фотоколориметрируют на ФЭК на зеленом светофильтре. Концентрацию белка определяют по калибровочному графику.

Диагностическое значение:

Функциональная протеинурия (без поражения паренхимы почек) проявляется при физической нагрузке, нервно-эмоциональном потрясении, избыточной белковой пищи, декомпенсированном пороке сердца, опухолях, локализованных в брюшной полости, асците. У детей и подростков белок в моче может появляться в утреннее время (ортостатическая протеинурия), у новорожденных наблюдается физиологическая протеинурия, которая связана с несовершенством функционирования почек.

Органическая протеинурия обусловлена поражением паренхимы почек (истинная протеинурия) и сопровождается гломерулонефритом, некронефрозом, нефротическим синдромом. По качественному составу в моче присутствуют белки с небольшой молекулярной массой (альбумины) способные проходить через почечный фильтр при физиологической протеинурии. При органическом поражении почек в моче появляются белки с большой молекулярной массой. Почечную протеинурию следует отличать от внепочечной, которая связана с воспалением органов мочеполовой системы. В отличие от почечной протеинурии, при внепочечной протеинурии после центрифугирования белок в моче не определяется. Кроме того, в моче может появляться патологический белок Бенс-Джонса. Белок Бенс-Джонса представляет собой термостабильный низкомолекулярный парапротеин с молекулярной массой 20000–45000, он обнаруживается при миеломной болезни и макроглобулинемии Вальденстрема. Белок Бенс-Джонса является легкими цепями иммуноглобулинов. Благодаря небольшой молекулярной массе белок легко проходит через почечный фильтр и определяется при помощи реакции термопреципитации.

3. Определение глюкозы в моче

Диагностическое значение

В норме в моче содержится 0,2–0,4 г/л глюкозы и она не обнаруживается обычными методами. Физиологическая глюкозурия наблюдается при повышенной физической нагрузке, приеме лекарственных препаратов (кофеина, фенамина, кортикостероидов). Почечная глюкозурия обусловлена снижением реабсорбционной функции канальцев нефронов, проявляется при гломерулонефрите, нефротическом синдроме, острых отравлениях. При этом уровень глюкозы в крови в норме. Выделение с мочой больших количеств глюкозы, глюкозурия, наступает обычно вслед за повышением содержания сахара в крови. Патологическая глюкозурия проявляется при сахарном диабете, тиреотоксикозе, опухолях. В тяжелых случаях содержание глюкозы в моче может достигать до 80–100 г/л.

4. Определение кетоновых тел

Диагностическое значение

В норме содержание кетоновых тел (ацетон, ацетоацетат, гидроксипутират) доступными методами не определяется. Кетоновые тела появляются в моче при нарушениях углеводного и жирового обмена. Увеличение содержания кетоновых тел наблюдается при сахарном диабете, голодании, лихорадке, употреблении белково-

углеводной пищи, гиперинсулинизме, инфекциях. Кетонурия центрального происхождения наблюдается при субарахноидальном кровоизлиянии, черепно-мозговой травме, сильном возбуждении или раздражении центральной нервной системы.

5. Определение желчных пигментов

Диагностическое значение

Желчные пигменты — билирубин, биливердин и другие в норме в моче отсутствуют. Желчные пигменты появляются в моче обычно в виде щелочных солей при желтухах различного генеза (паренхиматозной, механической, гемолитической). При билирубинемии моча приобретает зеленоватый оттенок различной интенсивности. Появление билирубина в моче свидетельствует о грубых нарушениях в гепатобилиарной системе.

6. Обнаружение пигментов крови

Гемоглобинурия, появление гемоглобина в моче, может быть первичной — холодовая, маршевая, пароксизмальная ночная (анемия Маркиафава–Минели), связанная с нарушением проницаемости кровеносных сосудов почек. Вторичная гемоглобинурия, связанная с гемолизом эритроцитов, развивается в результате переливания несовместимой группы крови, отравлении анилиновыми красителями, сульфаниламидами, при ожогах, тяжелых инфекционных заболеваниях.

Присутствие в моче пигментов крови открывают с помощью гваяковой пробы. Если моча щелочная, то ее следует подкислить и прокипятить, т.к. наличие в моче гноя дает положительную реакцию.

7. Определение индикана

Индикан – это калиевая или натриевая соль индоксилсерной кислоты. В норме содержание индикана в моче незначительно, но при некоторых патологических состояниях (непроходимость кишечника, перитонит), связанных с усилением процессов гниения белка в кишечнике, при туберкулезе количество индикана увеличивается.

Оформление работы

Отмечают принцип методов, результаты оформляют в виде таблицы. Делают вывод о возможных патологиях.

Образец таблицы для оформления результатов

Показатель	Норма	Исследуемый образец			
		1	2	3	4
Цвет	Соломенно-желтый				
Плотность	1,001–1,040				
pH	5,0–7,0				
Креатинин	1,0–2,0 г/сут				
Мочевая кислота	0,4–1,0 г/сут				
Индикан	5–20 мг/сут				
Белок	отр				
Глюкоза	отр				
Ацетоновые тела	отр				
Билирубин	отр				

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. В лабораторию доставлена моча нескольких пациентов: 1 – цвет насыщенно-желтого цвета, плотность 1,025; 2 – соломенно-желтая, плотность 1,052; 3 – бесцветная, плотность 1,001. Имеется ли зависимость между интенсивностью окраски и плотностью мочи, имеет ли диагностическое значение нарушение этого соотношения?
2. В лабораторию доставлена моча нескольких пациентов: А – имеет соломенно-желтый цвет; Б – ярко-желтый; В – цвет пива; Г – цвет «мясных помоев». Какие вещества оказывают влияние на цвет мочи?
3. Согласно рекомендации врача пациент ограничил употребление мяса, рыбы и значительно увеличил содержание в пище овощей и фруктов. Как изменяется pH мочи? Изменится ли содержание в моче мочевины?
4. В моче ребенка и взрослого мужчины обнаружен креатинин и креатин. Является ли это отклонением от нормы?
5. В моче пациента отмечено существенное увеличение концентрации креатинина. Какие причины креатининурии?
6. У больного значительно повысился уровень аммонийных солей в моче, хотя характер питания не изменился. Появилась глюкозурия. Ваши предположения? Какие дополнительные исследования необходимо провести?
7. Какие изменения щелочных резервов крови можно ожидать у человека при длительном выделении с мочой повышенного количества аммонийных солей?

8. Установлено, что с мочой больного выделяется за сутки 1 г аммиака в виде аммонийных солей. Сколько аммиака выделяется с мочой здорового человека? Есть ли нарушения в выделении аммиака у исследуемого больного? При каких заболеваниях выделение аммиака с мочой меняется (повышается или снижается)?
9. У больного ребенка в моче методом хроматографии обнаружена фенилпировиноградная кислота, а в крови фенилаланин (0,4 г/л). Встречается ли фенилпировиноградная кислота в моче здоровых людей? Каково происхождение этого соединения? Для какого заболевания типичны подобные данные биохимического анализа мочи и крови?
10. О нарушении метаболизма какого вещества свидетельствует наличие пролина и оксипролина в моче больного, жалующегося на хроническую боль в суставах?
11. В детскую клинику на обследование поступил трехмесячный ребенок. При исследовании у него была выявлена аминокислота. Может ли это явление указывать на патологию азотистого обмена?
12. У больного с мочой за сутки выделяется 1,5 г мочевой кислоты (норма до 0,7 г), повышено ее содержание и в крови. Врач назначил лечебный препарат гипоксантин, рекомендовал ограничить мясную пищу. Какую болезнь Вы диагностируете? Принцип действия гипоксантина?
13. При многократных анализах мочи у больного обнаруживаются значительные количества уратов. как открыть ураты в моче? Объясните причину уратурии. Какую диету следует рекомендовать больному?
14. Несколько лыжников совершили большой переход в условиях холодной погоды. У некоторых лыжников при исследовании в моче обнаружен белок. Почему появился белок у здоровых спортсменов?
15. Как отличить гематурию от гемоглобинурии, если в том и другом случаях моча содержит гемоглобин?
16. Рассказывая о своей болезни, больной сообщил врачу, что его моча имеет запах фруктов. Следует ли врачу обратить на это внимание?
17. Больной жалуется на то, что в последнее время у него выделяется темная моча. Как определить причину таких изменений?
18. Больной длительное время находился в постели в неподвижном состоянии по поводу болезни сердца. Проведенный анализ мочи показал нарастание содержания солей Ca^{2+} . Связано ли это с основной болезнью или с какой-либо другой причиной?

19. Исследование крови и мочи больного показало, что в крови уровень сахара в пределах нормы; в моче – проба на глюкозу положительная. Может ли быть глюкозурия без гипергликемии? Следует ли полученные результаты анализов считать ошибочными.
20. В результате дегенеративного процесса поражен юкстгломерулярный аппарат петли Генле и приводящих артериол. Какие изменения и почему могут возникнуть в водно-солевом обмене?

РАЗДЕЛ 12

ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

Актуальность

Гормоны – соединения разной химической природы (аминокислоты, белки, стероиды), которые синтезируются в специализированных клетках эндокринных желез, поступают в кровь и регулируют обмен веществ в органах-мишенях. Нейрогормональная регуляция метаболизма способствует адаптации организма к изменяющимся условиям существования и стабилизации гомеостаза.

Гормоны в крови присутствуют в низких концентрациях, в связи с чем их определение представляет трудности. Исторически определение концентраций гормонов начиналось с биологических методов с использованием целых животных или клеточных культур, затем появились химические способы определения, обладающие слабой чувствительностью и специфичностью. В настоящее время используются высоко специфичные методы, основанные на реакции антиген – антитело, и различающиеся способами регистрации результата: радиоиммунные, иммунохемилюминесцентные и иммуноферментные.

Цель

Знакомство со строением и функциями, особенностями рецепции гормонов и передачей сигнала в клетке, метаболическими эффектами гормонов.

Необходимо знать:

1. Классификацию гормонов и механизм их действия, клетки-мишени.
2. Биохимические эффекты гормонов всех эндокринных желез: регуляцию ключевых моментов белкового, углеводного и липидного обменов.
3. Регуляцию секреции гормонов.

Необходимо уметь:

1. Работать с лабораторными животными (декапитация, взятие крови).
2. Производить внутрибрюшинное введение животным лекарственных растворов.

Вопросы для самоподготовки:

1. Классификация гормонов по месту синтеза и по химической природе (производные аминокислот; пептиды; белки; сложные белки; стероиды).
2. Механизм действия гормонов. Мембранные и цитоплазматические рецепторы. Понятие о вторичных месенджерах и посредниках гормональных сигналов. Фосфопротеинкиназы.
3. Роль циклических нуклеотидов в реализации действия гормонов, их образование и распад. Инозитолфосфаты и диацилглицерол, образование, роль в опосредовании гормональных эффектов. Ca^{2+} -опосредованные механизмы.
4. Рилизинг-факторы гипоталамуса и тропные гормоны гипофиза.
5. Гормоны щитовидной и паращитовидной желез.
6. Гормоны поджелудочной железы.
7. Гормоны коркового и мозгового слоя надпочечников.
8. Гормоны половых желез.
9. Гормоны опосредующие острый стресс и хроническое напряжение. Гормоны, влияющие на липидный обмен.
10. Гормональные заболевания – несахарный диабет, карликовость, акромегалия, болезнь Иценко–Кушинга, «бронзовая» болезнь, кретинизм, микседема, базедова болезнь, сахарный диабет? Недостаток каких гормонов вызывает эти заболевания?

Задание

Заполните таблицу «Классификация гормонов. Мишени. Влияние на обмен веществ».

Образец таблицы для оформления результатов

Название и химическая природа гормона	Место синтеза	Органы-мишени	Локализация рецепторов, механизм действия	Влияние на обмен				Болезни, обусловленные отсутствием или избытком гормона
				углеводов	белков	липидов	минеральных веществ	

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Исследование влияния инсулина и адреналина на концентрацию глюкозы в крови крыс.

Реактивы

1. Фармакопейный препарат инсулина, 40 МЕ/мл.
2. Фармакопейный препарат адреналина – 0,1%.
3. Физиологический раствор – 0,9% NaCl.
4. 5,0% раствор цитрата натрия.
5. Набор реактивов для определения концентрации глюкозы в крови.

Проведение эксперимента

В работе используется четыре лабораторные крысы. Первая крыса является интактной и служит контролем на процедурный стресс. Второй крысе (контроль на введение гормонов) вводится внутривентриально 0,2 мл физиологического раствора, третьей – внутривентриально раствор инсулина из расчета 1,5 МЕ/кг массы в объеме 0,2 мл, четвертой – внутривентриально 0,1% раствора адреналина в дозе 0,3 мл/кг массы.

Через 30–40 мин животных под легким эфирным наркозом декапитируют. При получении крови предварительно смачивают пробирку и воронку раствором цитрата натрия.

Концентрацию глюкозы в крови определяют глюкозооксидазным методом. Отмечается характер изменения концентрации глюкозы крови у всех животных и делается вывод о влиянии на него процедурного стресса, адреналина и инсулина.

Оформление работы

Отмечают принцип метода, результаты проведения анализа. Делают вывод о влиянии гормонов на уровень глюкозы в крови.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. К указанным гормонам подберите соответствующие органы-мишени.
2. Выберите гормоны, которые обеспечивают указанные изменения в органах-мишенях.
 1. Стимулирует распад гликогена в печени и мышцах.
 2. Стимулирует липолиз в жировой ткани.
 3. Стимулирует глюконеогенез.
 4. Усиливает катаболизм аминокислот в мышцах.

А. Адреналин
В. Инсулин
С. Кортизол

5. Увеличивает скорость поступления глюкозы в клетки мышц и жировой ткани.
6. Стимулирует синтез жиров в жировой ткани.

3. Выберите положения, правильно отражающие функции глюкокортикоидов.

1. Увеличивают скорость поступления глюкозы в клетки мышц и жировой ткани.
2. Уменьшают скорость поступления аминокислот в клетки мышечной ткани.
3. Стимулируют синтез специфических белков в лимфоидной и соединительной ткани.
4. Стимулируют глюконеогенез.
5. Стимулируют синтез гликогена в печени.
6. Увеличивают скорость катаболизма аминокислот в печени и мышцах.
7. Стимулируют липолиз в жировой ткани.

4. Представьте последовательность событий, происходящих при передаче гормонального сигнала в клетки жировой ткани при участии глюкагона, используя цифровые обозначения.

1. Взаимодействие гормона со специфическим рецептором.
2. Активация протеинкиназы.
3. Образование цАМФ.
4. Активация аденилатциклазы.
5. Гидролиз триацилглицеролов.
6. Фосфорилирование ТАГ-липазы.

5. Используя цифровые обозначения, представьте последовательность событий, обеспечивающих стимуляцию глюконеогенеза при голодании.

1. Проникновение кортизола в клетки.
2. Синтез и секреция кортиколиберина.
3. Взаимодействие кортизола с рецептором.
4. Взаимодействие кортикотропина с рецептором.
5. Связывание комплекса гормон-рецептор с хроматином.
6. Активация аденилатциклазы.
7. Синтез и секреция кортизола.
8. Синтез и секреция кортикотропина.
9. Индукция синтеза ферментов глюконеогенеза.

6. Расставьте цифры в порядке, отражающем последовательность

событий, происходящих в гепатоците под влиянием адреналина.

1. Гликоген → Глюкозо-1-фосфат.
2. Аденилатциклаза неактивная → Аденилатциклаза активная.
3. Адреналин → Комплекс гормон-рецептор.
4. Протеинкиназа неактивная → Протеинкиназа активная.
5. Фосфорилаза «b» → Фосфорилаза «a».
6. АТФ → цАМФ.

7. При поступлении в организм большого количества углеводов усиливаются процессы депонирования энергетического материала.

А. Выберите гормоны, обеспечивающие эти процессы.

1. Глюкагон.
2. Альдостерон
3. Адреналин.
4. Инсулин.
5. Кальцитонин.
6. Кортизол.

Б. Выберите изменения метаболизма, возникающие в органах-мишенях под влиянием выбранных гормонов.

1. Усиление синтеза гликогена в печени.
2. Усиление синтеза жиров из углеводов.
3. Усиление распада гликогена в печени и мышцах.
4. Увеличение скорости поступления глюкозы и аминокислот в ткани.
5. Ускорение липолиза в жировой ткани.
6. Ускорение глюконеогенеза в печени.

8. По мере исчерпания запаса гликогена в организме усиливается катаболизм жиров. Известно, что «жиры сгорают в пламени углеводов».

А. За счет какого процесса в этих условиях поддерживается необходимая концентрация глюкозы?

Б. Выберите признаки, характерные для 3-дневного голодания:

1. Кетонемия.
2. Азотемия.
3. Азотурия.
4. Гиперглюкоземия.
5. Алкалоз.
6. Гипогликемия.

9. Выберите симптомы, характерные для сахарного и несахарного диабета.

1. Гипергликемия. | **А.** Характерно только для сахарного

- | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> 2. Полиурия. 3. Кетонемия. 4. Ацидоз. 5. Азотемия. | <ul style="list-style-type: none"> диабета. В. Характерно только для несахарного диабета. С. Характерно для обоих заболеваний. Д. Не характерно ни для одного заболевания. |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

10. Выберите изменения, характерные для избыточной секреции кортизола и альдостерона.

- | | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> 1. Повышение концентрации натрия в плазме крови. 2. Гипогликемия. 3. Гипертензия. 4. Увеличение 17-кетостероидов в моче. 5. Повышенное выведение натрия с мочой. 6. Нарушение водно-электролитного баланса. | <ul style="list-style-type: none"> А. Характерно для гипокортицизма. В. Характерно для гиперальдостеронизма. С. Характерно для обоих заболеваний. Д. Нехарактерно ни для одного заболевания. |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

11. Больному, страдающему хроническим инфекционно-аллергическим заболеванием, в течение длительного периода назначали преднизолон (структурный аналог кортизола). После улучшения состояния препарат отменили. Вскоре после этого появились признаки гипокортицизма (слабость, гипотония, гипогликемия). Концентрация 17-кетостероидов в моче ниже нормы.

- 1. Чем объясняется ухудшение состояния больного?
- 2. Наступит ли улучшение в состоянии больного, если ему ввести кортикотропин?

12. Выберите типы клеток, не являющихся мишенями тиреоидных гормонов.

- 1. Гепатоциты.
- 2. Адипоциты.
- 3. Мышечные клетки.
- 4. Половые клетки.
- 5. Клетки соединительной ткани.
- 6. Клетки мозга.

13. Выберите свойства гормонов, отличающие их от других биологических регуляторов.

- 1. Действуют при очень низких концентрациях.
- 2. Действуют через специфические рецепторы.

3. Поступают в клетки-мишени из крови.
4. Секретируются специализированными эндокринными клетками.
5. Обладают относительной стабильностью.

14. Тестостерон, прогестерон, альдостерон способны воспроизводить некоторые эффекты кортизола. Чем обусловлена перекрестная активность этих гормонов?

1. Гомологичностью гормон-связывающих участков соответствующих рецепторов.
2. Взаимодействием гормонов с «чужим» рецептором.
3. Гомологичностью ДНК-связывающих доменов соответствующих рецепторов.
4. Сходством гормон-чувствительных элементов контролируемых гормонами генов.

15. В нормальных условиях скорость секреции адреналина ($C_9H_{13}NO_3$) мозговым слоем надпочечников такова, что концентрация этого гормона в крови поддерживается на уровне 10^{-10} М. Для того, чтобы оценить, что означает эта концентрация, рассчитайте, каков должен быть диаметр (в метрах) бассейна глубиной 2 м, чтобы при растворении в нем 1 г адреналина концентрация его оказалась равной его физиологической концентрации в крови.

16. Время жизни большинства гормонов в крови относительно невелико. Так, если ввести животному радиоактивно меченый инсулин, то половина введенного гормона исчезнет из крови в течение 30 мин. Почему важна быстрая инактивация циркулирующих гормонов? Как может обеспечиваться постоянство уровня гормонов в крови в нормальных условиях, если учитывать его быструю инактивацию? Какими путями организм осуществляет быстрые изменения концентрации циркулирующих гормонов в организме?

17. Грамотрицательная бактерия *Vibrio cholerae* вырабатывает белок-холерный токсин (мол. масса=90 000), вызывающий характерные симптомы холеры, а именно потерю организмом больших количеств воды и ионов Na^+ вследствие продолжительной обессоливающей диареи. Если не восполнить эти потери, то происходит тяжелое обезвоживание организма: без лечения болезнь часто приводит к смерти. Попавший в организм человека холерный токсин прочно связывается со специфическими участками на плазматической мембране эпителиальных клеток, выстилающих тонкий кишечник, и тем самым вызывает продолжительную (измеряемую часами и днями) активацию аденилатциклазы. Каким образом холерный

токсин влияет на содержание цАМФ в клетках кишечника? Основываясь на приведенных выше фактах, что можно сказать о функции цАМФ в клетках слизистой кишечника в нормальных условиях? Предложите возможный способ лечения холеры.

18. В ситуации «борьба или бегство» выделение адреналина стимулирует распад гликогена в печени, сердце и скелетных мышцах. В этих условиях продуктом распада гликогена в печени является глюкоза. В скелетных же мышцах гликоген в конечном итоге расщепляется до продуктов гликолиза.

1. Почему конечные продукты расщепления гликогена в этих двух тканях оказываются разными?
2. Какие преимущества для организма, находящегося в критической ситуации, создает наличие этих специфических путей распада гликогена?

19. При некоторых видах злокачественных опухолей поджелудочной железы происходит избыточный синтез инсулина β -клетками. У больных при этом наблюдаются слабость, дрожь, утомляемость, потливость и постоянное чувство голода. Если болезнь затягивается, может происходить нарушение мозговой деятельности. Как влияет избыточная секреция инсулина на обмен углеводов, аминокислот и липидов в печени? Почему развиваются описанные симптомы? Объясните, почему это приводит к нарушениям мозговой деятельности.

20. Гормоны щитовидной железы участвуют в регуляции скорости основного обмена (базального метаболизма). При введении избытка тироксина в печени животного возрастают скорость потребления O_2 и выработка тепла (термогенез), но концентрация АТФ в ткани остается на уровне нормы. Были предложены разные объяснения термогенного действия тироксина. Одно из них состоит в том, что избыток тиреоидного гормона вызывает разобщение окислительного фосфорилирования в митохондриях. Каким образом, исходя из этого объяснения, можно понять приведенные выше наблюдения? Согласно другому объяснению, термогенез обусловлен повышением скорости использования АТФ в стимулируемых тироксином тканях. Считаете ли Вы такое объяснение правильным? Почему?

21. Овариэктомия, т. е. удаление яичников, служит одним из средств лечения рака груди. Объясните, какова биохимическая основа такого лечения. В качестве дополнительного способа лечения этого заболевания женщинам вводят мужские половые гормоны, что приводит к торможению физиологических реакций на собственные половые гормоны организма.

22. Помимо катехоламинов в мозговом слое надпочечников вырабатываются также некоторые эндорфины, иногда называемые «собственными опиатами мозга». Попробуйте объяснить, почему эндорфины синтезируются и в мозгу, и в мозговом слое надпочечников.

23. Если кальмодулин, выделенный из мышц моллюсков, добавить к фосфодиэстеразе, выделенной из печени крысы, то это не отразится на скорости медленного гидролитического превращения цАМФ в АМФ. Однако добавление к этой системе ионов Ca^{2+} приводит к значительному повышению активности фосфодиэстеразы. Какую биохимическую информацию несут эти наблюдения?

ПРИМЕРНЫЕ ТЕМЫ РЕФЕРАТИВНЫХ СООБЩЕНИЙ

1. Апоптоз, отличия от некроза, морфология, молекулярные причины и значение.
2. Научные концепции в развитии науки о питании. Рациональное питание. Сбалансированная диета. Возможность использования диет в лечении.
3. Биохимия голодания. Использование голодания в лечении заболеваний.
4. Конституция человека, причины возникновения различных соматотипов. Влияние факторов среды.
5. Кожный покров. Строение, биомолекулы, ферменты кожи.
6. Молекулярные и физиологические механизмы действия никотина.
7. Молекулярные и физиологические механизмы действия алкоголя. Отравление алкоголем.
8. Молекулярные и физиологические механизмы действия наркотических веществ. Отравление наркотиками.
9. Моделирование структуры биомолекул. Предсказание конформации пептидов и белков.
10. Участие глицина в реакциях синтеза различных соединений.
11. Наследственные нарушения обмена фенилаланина и тирозина: фенилкетонурия, альбинизм, алкаптонурия.
12. Наследственные нарушения обмена валина, лейцина и изолейцина: синдром «мочи с запахом кленового сиропа».
13. Несбалансированная диета – болезнь недостаточности полноценного белка в рационе: квашиоркор, причины, проявления, лечение.
14. Сравнительная характеристика миоглобина и гемоглобина.
15. Гемопротейны, сравнительные аспекты в строении и функционировании гемоглобина, миоглобина, цитохромов.
16. Взаимосвязь структуры и функций белков на примере строения гемоглобина. Серповидноклеточная анемия.
17. Нуклеопротеины и гистоны. Строение, роль в регуляции репликации ДНК и пролиферации клеток.
18. Фосфопротеины. Механизм фосфорилирования белков, фосфокиназы, фосфатазы.
19. Фибронектин, строение, функции в организме.
20. Коллаген, строение, уровни организации, функции в организме.
21. Биологические антифризы и механизм их действия.
22. Гликопротеины сыворотки крови и мочи. Клиническое значение.

23. Белки «острой фазы», представители, диагностическое значение.
24. Метаболизм железа в организме. Роль ферритина и трансферрина. Состояния, связанные с дефицитом железа в организме.
25. Ферментативная роль металлопротеинов.
26. Действие солей тяжелых металлов на организм. Связь содержания тяжелых металлов в биологических жидкостях и во внешней среде.
27. Антивитамины. Практическое значение использования антивитаминов.
28. Профилактика рахита у детей. Роль кальция и витамина D.
29. Витамин F. Участие в обмене липидов. Значение в синтезе биологически активных веществ.
30. Роль витамина F в профилактике атеросклероза.
31. Использование витамина F и ненасыщенных жирных кислот в косметологии и медицине.
32. Обмен веществ при физической работе различной интенсивности.
33. Гипергликемии и гипогликемии. Причины и следствия.
34. Биохимические причины осложнений при сахарном диабете.
35. Ожирение. Биохимические аспекты. Нарушение обмена веществ при ожирении. Возможности коррекции и терапии ожирения естественными методами.
36. Транспорт липидов в крови. Липопротеины, строение, функции, обмен, ферменты.
37. Гиперхолестеролемии. Атеросклероз, причины, биохимические аспекты, развития, профилактика.
38. Простагландины, строение, синтез, роль в развитии воспалительных заболеваний.
39. Ионофоры и разобщители. Важнейшие представители. Использование в научных и практических целях.
40. Свободнорадикальное окисление. Перекисное окисление липидов. Антиоксиданты. Роль свободнорадикального окисления в развитии заболеваний.
41. Микросомальное окисление, его роль в организме.
42. Оксид азота, его действие на внутриклеточные процессы.
43. Вторичные мессенджеры гормонов (цАМФ, цГМФ), строение рецепторов. Взаимодействие мессенджеров между собой.
44. Вторичные мессенджеры гормонов (ДАГ, ФИФФ, Ca²⁺), строение рецепторов. Взаимодействие мессенджеров между собой.
45. Значение нейропептидов в интегративной деятельности головного мозга.
46. Клинические аспекты применения стероидных гормонов.
47. Механизм действия инсулина. Нарушения обмена веществ при

- сахарном диабете.
48. Гормональный статус и заболевания щитовидной железы.
 49. Эндокринная функция тимуса.
 50. Взаимосвязь уровня гормонов в сыворотке крови и конституции человека.
 51. Коррекция гормонального статуса. Физиологические и природные факторы, влияющие на уровень гормонов в крови.
 52. Гормональные механизмы месячных циклов, беременности и контрацепции.
 53. Гормональные и биохимические механизмы стресса.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТУРАТУРА

Основная

1. Березов, Т.Т. Биологическая химия [Электронный ресурс]: учебник / Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. – 3-е изд., стереотип. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2008. – 704 с.: Режим доступа: <http://www/studentlibrary.ru>
2. Биохимия: учебник для студентов медицинских вузов; под ред. Е.С. Северина. – 5-е изд., испр. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 786 с.
3. Биохимия [Электронный ресурс]: учебник для студентов мед. Вузов; под ред. Е.С. Северина. – 5-е изд. испр. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. – 768 с.: Режим доступа: <http://www/studentlibrary.ru>
4. Нельсон, Д. Основы биохимии Ленинджера: в 3 т.: пер с англ. / Д. Нельсон, М. Кокс. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – Т.1. – 694 с.
5. Нельсон, Д. Основы биохимии Ленинджера: в 3 т.: пер с англ. / Д. Нельсон, М. Кокс. – М.: БИНОМ. «Лаборатория знаний», 2011. – Т.2.– 636 с.

Дополнительная

1. Биохимия с упражнениями и задачами: учебник для вузов; под ред. Е.С. Северина. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 384 с.
2. Биологическая химия с упражнениями и задачами [Электронный ресурс]: учебник; под ред. С.Е. Северина. – 2-е изд., испр. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. – 624 с.: Режим доступа: <http://www/studmtdlib.ru>

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
Список сокращений	6
Примерные экзаменационные вопросы по курсу «Общая биохимия»	7
Раздел 1. ПРЕДМЕТ БИОХИМИИ. ЗАДАЧИ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	11
Тема 1.1. Правила работы в биохимической лаборатории. Техника безопасности. Химическая посуда и оборудование	11
Раздел 2. АМИНОКИСЛОТЫ, ПЕПТИДЫ, БЕЛКИ. СТРУКТУРА, СВОЙСТВА И ФУНКЦИИ	18
Тема 2.1. Аминокислотный состав белков	18
Тема 2.2. Физико-химические свойства белков. Методы белковой химии	26
Тема 2.3. Количественное определение белка в растворе	42
Тема 2.4. Сложные белки	53
Раздел 3. ВНЕШНИЙ И ПРОМЕЖУТОЧНЫЙ ОБМЕН БЕЛКОВ	55
Тема 3.1. Внешний обмен белков	55
Тема 3.2. Внутриклеточные превращения аминокислот ..	59
Тема 3.3. Конечные продукты белкового обмена	64
Тема 3.4. Пигментный обмен	68
Раздел 4. ФЕРМЕНТЫ. КЛАССИФИКАЦИЯ, СТРУКТУРА И СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ	85
Тема 4.1. Свойства ферментов	86
Тема 4.2. Определение активности ферментов. Единицы измерения	90
ТЕМА 4.3. Кинетика ферментативных реакций	92
Раздел 5. ВИТАМИНЫ, СТРОЕНИЕ, КОФЕРМЕНТНЫЕ ФОРМЫ И ФУНКЦИИ В ОРГАНИЗМЕ	101
Тема 5.1. Количественное определение витаминов в различных продуктах и биологических жидкостях	103
Раздел 6. СТРУКТУРА И ОБМЕН НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ	108
Тема 6.1. Выделение, определение количества, чистоты и нативности нуклеиновых кислот	108

Раздел 7. УГЛЕВОДЫ. ОБМЕН УГЛЕВОДОВ	120
Тема 7.1. Методические подходы к определению концентрации глюкозы в биологическом материале.....	122
Тема 7.2. Определение содержания метаболитов углеводного обмена в тканях.....	124
Раздел 8. ЛИПИДЫ. ОБМЕН ЛИПИДОВ	135
Тема 8.1. Структура, свойства и функции липидов.....	137
Тема 8.2. Внешний обмен липидов	141
Тема 8.3. Промежуточный обмен липидов	143
Раздел 9. ВЗАИМОСВЯЗЬ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ. ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТАБОЛИЗМА КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ. ЭТАПЫ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА	157
Раздел 10. БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ И ТКАНЕВОЕ ДЫХАНИЕ	158
Раздел 11. БИОХИМИЯ МОЧИ	164
Тема 11.1. Нормальные и патологические компоненты мочи.....	165
Раздел 12. ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ	178
Примерные темы реферативных сообщений.....	187
Рекомендуемая литература	190

Учебное издание

Татьяна Константиновна Климентьева
Ольга Евгеньевна Акбашева
Дмитрий Иванович Кузьменко

ПРАКТИКУМ ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ

для студентов
медико-биологического факультета

Издание 3-е переработанное и дополненное

Учебное пособие

Редактор А.Ю. Коломийцев
Технический редактор О.В. Коломийцева
Обложка Д.И. Кузьменко

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

Подписано в печать 13.06.2019 г.
Формат 60x84 $\frac{1}{6}$. Бумага офсетная.
Печать цифровая. Гарнитура «Times». Печ. лист 12,1. Авт. лист. 8.
Тираж 100 экз. Заказ № 26

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