

**МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО СПЕЦИАЛЬНОГО
ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН**

**ШАИРА ФАТХУЛЛАЕВНА КАРИМОВА,
ГУЛЗИРА ОРИНБАЕВНА ИСМАИЛОВА,
НАСИРДЖАН МУХАМЕДЖАНОВИЧ ЮЛДАШЕВ**

Область знаний – «Социальное обеспечение и здравоохранение» – 500000

Область образования – «Здравоохранение» – 510000

**УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ
ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ ПО БИОХИМИИ**

по предмету Биохимия
для направлений образования

«Педиатрическое дело» - 5510200

«Профессиональное образование» - 5111000 («Лечебное дело»);

«Медико-биологическое дело» - 5510900; «Высшее сестринское дело» -
5510700

Ташкент – 2021

Рекомендовано методическим советом ТашПМИ в качестве учебного пособия для студентов, обучающихся по программам бакалавриата и специалитета по направлениям подготовки биохимия.

Составители:

Кандидат биологических наук, доцент кафедры
медицинской и биологической химии, медицинской
биологии и общей генетики ТашПМИ

Ш.Ф. Каримова

Кандидат химических наук, доцент кафедры
медицинской и биологической химии, медицинской
биологии и общей генетики ТашПМИ

Г.О. Исмаилова

Доктор биологических наук, заведующий кафедрой
медицинской и биологической химии, медицинской
биологии и общей генетики ТашПМИ, профессор

Н.М. Юлдашев

Рецензенты:

Заведующий кафедрой медицинской и биологической
химии ТМА, д.м.н., профессор

Р.А. Сабирова

Заведующий кафедрой фармакологии и нормальной
физиологии ТашПМИ, д.м.н., профессор

С.Д. Аминов

Предлагаемое учебное пособие является необходимым дополнительным методическим пособием для изучения биологической химии студентами 2-го курса медицинского факультета. Для каждого практического занятия указаны актуальность изучаемой темы, цель, перечень теоретических вопросов для подготовки. Обязательными элементами изложения лабораторных работ является детальное разъяснение принципов метода и непосредственно методики выполнения работы, клинико-диагностическое значение метода в практической медицине. Задачей лабораторного практикума по биохимии является ознакомление студентов с основными методами биохимического анализа, а также закрепление теоретических знаний. На основании этого, формирование у студентов практических навыков в области статической, динамической и функциональной биохимии по основным разделам классической биохимии: углеводам, липидам, нуклеиновым кислотам, белкам, ферментам, витаминам и др. Лабораторный практикум содержит стандартные, рутинные и современные работы разной степени сложности, позволяющие студентам овладевать методами биохимических исследований, умением анализировать полученные результаты.

Содержание и объем практикума отвечают количеству часов, отведённых на изучение курса биохимии студентами медицинских институтов

Оглавление		
	Предисловие	4
	Введение	7
I	Техника безопасности и методы оказания первой медицинской помощи при работе в химической лаборатории	9
II	Правила подготовки и оформление лабораторной работы	13
III	МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ	15
3.1	Исследование свойств аминокислот и белков	15
3.2	Исследование свойств ферментов. Биохимический состав и функции слюны	37
3.3	Основные понятия и принцип метода иммуноферментного анализа	46
3.4	Исследование свойств витаминов	53
3.5	Исследование свойств нуклеиновых кислот	77
3.6	Основные понятия и принцип метода полимеразной цепной реакции	84
3.7	Исследование свойств углеводов	100
3.8	Исследование свойств липидов	122
3.9	Исследование молока	149
IV	ОБМЕН ВЕЩЕСТВ	153
4.1	Исследование обмена и функции аминокислот	153
4.2	Исследование обмена сложных белков (изучение функции печени)	166
4.3	Хромопротеины. обмен гемоглобина и его нарушение. метаболизм порфиринов	172

4.4	Исследование свойств гормонов	185
4.5	Исследование мышц и соединительной ткани	190
4.6	Исследование костной ткани и тканей зуба. Минеральные и органические компоненты тканей зуба	192
4.7	Исследование крови	194
4.8	Исследование мочи	202
	Глоссарий	206
	Использованная литература	225

ВВЕДЕНИЕ

Биологическая химия – это наука о молекулярных основах жизни, она является одним из фундаментальных разделов современной биологии, изучающим химический состав организмов, превращение веществ и энергии, которое осуществляется в процессе их жизнедеятельности. Биохимия является базовой, фундаментальной дисциплиной в профессиональной подготовке студентов, обучающихся биологическим и медицинским специальностям, а также фармакологии, фармакотерапии, фармакогнозии, фармацевтической химии и другим профильным дисциплинам.

Важная роль в подготовке специалистов в области биохимии принадлежит такой дисциплине, как лабораторный практикум, в рамках которой студенты осваивают навыки работы в биохимических и биофизических лабораториях.

Задачей настоящего лабораторного практикума по биохимии является ознакомление студентов с основными методами биохимического анализа, а также закрепление теоретических знаний по предмету, формирование у студентов практических навыков в области статической, динамической и функциональной биохимии по основным разделам классической биохимии: углеводам, липидам, нуклеиновым кислотам, белкам, ферментам, витаминам и др. Лабораторный практикум содержит стандартные, рутинные и современные работы разной степени сложности, позволяющие студентам овладевать методами биохимических исследований, умением анализировать полученные результаты. Лабораторные работы включают описание принципа, пошагового выполнения, таблицы, контрольные вопросы и клинико–диагностическое значение метода.

Большое внимание уделяется правилам безопасности при работе в химической лаборатории и оформлению протокола лабораторной работы,

включая фиксирование результатов и формулировку выводов. С целью систематизации и контроля знаний, умений и навыков в конце каждой лабораторной работы даются вопросы для самоконтроля. Для самостоятельной теоретической подготовки в конце пособия приведён перечень наиболее употребительных в современной биохимии терминов и даны их определения. Представлен список рекомендуемых библиографических источников, включая основную и дополнительную литературу.

Лабораторный практикум может быть использован в качестве учебного пособия и методического руководства в учебной и научно-исследовательской работе при подготовке бакалавров, магистрантов, аспирантов и других научных работников. Приведённые в практикуме методики исследования применимы не только в биохимии, но и в смежных дисциплинах, таких как пищевая химия, энзимология, молекулярная биология и другие.

I. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ И МЕТОДЫ ОКАЗАНИЯ ПЕРВОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ ПРИ РАБОТЕ В ХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Помещение химической лаборатории должно быть просторным и светлым. Лаборатория должна быть снабжена необходимыми приборами и оборудованием. В каждой лаборатории должна быть хорошая вентиляция, необходимо наличие вытяжного шкафа, в котором проводят работы с использованием дурно пахнущих или ядовитых соединений, а также обжиг различных веществ. В специальных вытяжных шкафах хранят легколетучие, вредные, дурно пахнущие и легковоспламеняющиеся вещества (кислоты и щелочи, органические жидкости и др.). В лаборатории также необходимы водопровод, канализация, проводка электрического тока. Лаборатория должна иметь установку для дистилляции воды, так как все опыты нужно проводить только с использованием дистиллированной воды. Кроме рабочих столов в лаборатории должны быть письменные столы, шкафы и тумбочки для хранения посуды и реактивов, приборные столы для установки различных приборов.

При работе в химической лаборатории необходимо соблюдать следующие правила:

- Работа должна быть предварительно спланирована учащимся и одобрена преподавателем.
- На лабораторном столе во время работы не должно быть посторонних предметов.
- В лаборатории следует работать в хлопчатобумажном халате, волосы должны быть убраны.
- Строго запрещается принимать в лаборатории пищу.
- До и после выполнения работы необходимо вымыть руки.

- Работать нужно аккуратно, результат опыта зависит от чистоты проведения эксперимента.
- Все опыты с ядовитыми и пахучими веществами выполнять в вытяжном шкафу.
- Химические реактивы брать только шпателем, пинцетом или ложечкой (не руками!).
- Неизрасходованные реактивы не высыпать и не выливать обратно в те сосуды, откуда они были взяты.
- Работу с твёрдыми щелочами проводить только в защитных очках и перчатках.
- Жидкости переливать через химические воронки. Склянку, из которой переливают жидкость, необходимо держать этикеткой к руке во избежание её порчи.
- При нагревании растворов и веществ в пробирке необходимо использовать держатель. Отверстие пробирки должно быть направлено в сторону от себя и других работающих.
- Нельзя наклоняться над сосудом, в котором происходит нагревание или кипячение жидкости.
- При необходимости определить запах выделяющихся при реакции газов, нужно лёгким движением ладони направить струю газа от горла сосуда к себе и осторожно вдохнуть.
- При разбавлении концентрированных кислот и щелочей небольшими порциями приливать кислоту (или концентрированный раствор щелочи) в воду, а не наоборот.
- Опасные продукты реакции сливать только в соответствующие банки в вытяжном шкафу.

- Со всеми возникающими вопросами сразу же обращаться к преподавателю.

Методика оказания первой медицинской помощи.

Несчастные случаи в лаборатории могут быть вызваны термическими, химическими ожогами, ранениями и отравлениями. Для оказания первой помощи в лаборатории должна быть аптечка: бинты, вата, раствор уксусной кислоты 8 %, 3-5 % раствор йода, 1 % раствор борной кислоты, 2,5 % раствор двууглекислого натрия и другие. В тяжёлых случаях необходимо обратиться к врачу.

Ожоги: при термических ожогах (огнём, паром, горячими предметами) первой степени (покраснение) на обожжённое место следует наложить вату, смоченную 96 % этиловым спиртом. При ожогах второй степени (появление пузырьков) поступаю так же или накладывают вату, обработанную 3-5 % раствором марганца. В случае ожога третьей степени (разрушение тканей) раны накрывают стерильной салфеткой и немедленно вызывают врача.

При химических ожогах кислотами, обожжённое место обильно промывают водой, прикладывают примочки из 5 % раствора соды или фурацилина. При ожогах второй степени повязку со стрептоцидовой или синтомициновой эмульсией.

При химических ожогах щелочами и концентрированными растворами аммиака обожжённое место обильно промывают водой и накладывают повязки из 5 % раствора уксусной кислоты, лимонной кислоты.

При ожогах негашёной известью, известь смывают и смазывают растительным маслом или вазелином.

При ожоге формалином, обожжённое место промыть водой.

При попадании кислоты, щёлочи в глаз необходимо немедленно промыть большим количеством воды в течении 10-30 минут. Затем в случае

ожога кислотой 2-3 % раствором бикарбоната натрия, при ожоге щёлочью 2 % раствором борной кислоты, при попадании аммиака 0,5-1 % раствором квасцов. При химических ожогах полости рта щёлочью, рот прополаскивают 3 % раствором уксусной кислоты или 2 % раствором борной кислоты. При ожогах кислотами рот прополаскивают 8 % раствором бикарбоната натрия.

Ранения: при ранении стеклом рану очищают от осколков, а затем убедившись, что осколков стекла нет, смазывают йодом и завязывают бинтом. При сильных кровотечениях выше раны накладывают жгут, который можно держать не более 2 ч, обязательно под жгут следует положить записку с точным временем наложения жгута.

Отравления: во всех случаях отравление химикатами следует немедленно вызывать врача или пострадавшего немедленно отправлять в медпункт. В исключительных случаях при отравлении щелочами пострадавшему следует дать выпить молоко или 2 % раствор уксусной или лимонной кислоты, при отравлении кислотами дать выпить воду со льдом, 1 % раствор пищевой соды.

Вопросы и задания для самоконтроля:

1. Перечислите правила безопасности:
 - а) при работе в биохимической лаборатории;
 - б) при работе со стеклянной посудой;
 - в) при работе с нагревательными приборами;
 - г) при работе с электрическими приборами.
2. Какие действия запрещены при работе с электроприборами?
3. Перечислите меры безопасности при работе с кислотами.
4. Перечислите меры безопасности при работе со щелочами.
5. Какие действия выполняются:

- а) при работе с кислотами и щелочами;
- б) при оказании первой медицинской помощи при химических ожогах;
- в) при оказании первой медицинской помощи при термических ожогах.

II. ПРАВИЛА ПОДГОТОВКИ И ОФОРМЛЕНИЕ ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ

Форма протокола лабораторных работ

1. Дата выполнения.
2. Название работы.
3. Цель работы.
4. Принцип метода.
5. Химизм реакций.
6. Схема установки или рисунок прибора.
7. Последовательность проводимых операций.
8. Результаты экспериментальных наблюдений и измерений.
9. Метод расчёта.
10. Выводы.

Порядок подготовки к выполнению лабораторной работы

Студент должен иметь специальную тетрадь (рабочий журнал) для лабораторных работ. При подготовке к занятию требуется изучить теоретические основы соответствующей темы, используя лекции и источники, указанные в списке литературы. В теоретическом введении к разделам практикума раскрываются основные понятия биохимии биомолекул, при этом ключевые слова выделены жирным шрифтом. Для успешного усвоения изучаемой темы студенты должны выполнить задания и ответить на вопросы, которые приведены в соответствующем разделе

практикума. Далее студент должен внимательно ознакомиться с методикой выполнения лабораторной работы, изложенной в практикуме, и заполнить пункты 1–6 протокола по прилагаемому образцу. Теоретические вопросы по теме и особенности выполнения предстоящей работы обсуждаются преподавателем и студентами непосредственно на занятии перед проведением работы. После обсуждения со студентами протокол (раздел 7 «Последовательность проводимых операций») может быть дополнен. Завершив подготовку, можно получить реактивы, лабораторную посуду и приступить к самостоятельному выполнению работы.

Порядок оформления экспериментальных результатов

Результаты экспериментальных наблюдений и измерений при проведении лабораторной работы заносят в протокол (пункт 8). По полученным экспериментальным данным проводят необходимые расчёты (пункт 9). Лабораторная работа считается выполненной только после выводов, полученных по результатам работы (пункт 10). Выводы должны содержать краткий анализ наблюдаемых изменений и полученных результатов. В протоколах некоторых работ могут отсутствовать отдельные пункты (например, пункт 6) или могут быть дополнительно внесены объяснения, таблицы или графики.

ВНИМАНИЕ!

После выполнения работы и проверки полученных результатов студент обязан:

- вымыть и сдать лаборанту посуду;
- убрать своё рабочее место;
- представить преподавателю тетрадь с протоколом.

Работа считается выполненной после подписания протокола преподавателем.

III. МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ АМИНОКИСЛОТ И БЕЛКОВ

Белки — высокомолекулярные азотсодержащие органические соединения, молекулы которых построены из α , L-аминокислот (простые белки), а также содержащие ещё и другие дополнительные компоненты: ионы металлов, неорганические и органические простетические группы (сложные белки).

Белки как основа всего живого были издавна в центре внимания исследователей. Более чем двухсотлетняя история химии белка наполнена непрерывным совершенствованием экспериментальных методов и богата различными теоретическими концепциями. Химия белка — это особая область, которая соединила в себе идеи и методы биологии, химии, физики, медицины. Белки — материальная основа деятельности клетки. Функции белков в природе универсальны: каталитические, транспортные, защитные, структурные, сократительные, дыхательные, запасные, регуляторные и др. Невозможно представить работу генетического аппарата клетки без участия белков, осуществляющих репликацию, транскрипцию, трансляцию информации.

Белки составляют основу структуры и функции живых организмов, подсчитано, что в природе встречается примерно 10^{10} – 10^{12} различных белков, обеспечивающих существование около 10^6 живых организмов, от вирусов до человека. Каждый организм характеризуется уникальным набором белков. Фенотипические признаки и многообразие функций обусловлены особенностями пространственной структуры белков, зависящей от последовательности одних и тех же аминокислотных остатков, а также специфичностью объединения белков во многих случаях в виде

надмолекулярных и мультимолекулярных структур, в свою очередь определяющих ультраструктуру клеток и их органелл.

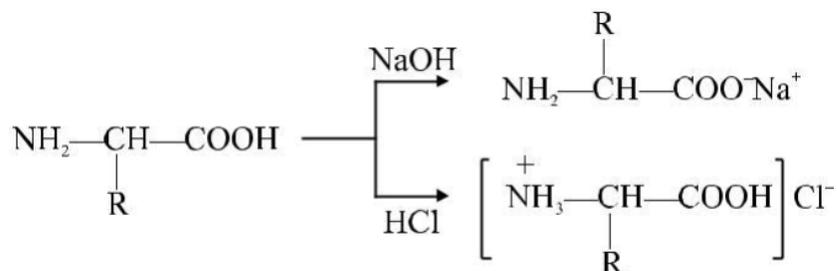
Аминокислотный состав белков

Все многообразие белков построено из α -аминокислот. Общее число α -аминокислот, входящих в их состав, близко к 70. Среди них выделяется группа из 20 наиболее важных α -аминокислот, постоянно встречающихся во всех белках. Аминокислоты — кристаллические вещества, растворимые в воде. В твёрдом состоянии α -аминокислоты существуют в виде биполярного иона. α -Аминокислоты — гетерофункциональные соединения, содержащие карбоксильную и аминогруппу у одного и того же α -углеродного атома.

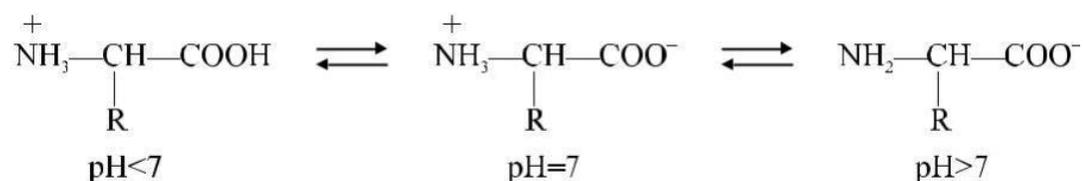
Принцип построения α -аминокислот, т. е. нахождения у одного и того же атома углерода двух различных функциональных групп, радикала и атома водорода, предопределяет хиральность (асимметричность) α -углеродного атома (исключение составляет глицин). Почти все природные α -аминокислоты принадлежат к L-ряду (расположение аминогруппы в проекционной формуле Фишера слева).

Использование для построения белков живых организмов только энантиомеров L-ряда имеет важнейшее значение для формирования пространственной структуры белков и проявления ими биологической активности.

α -Аминокислоты являются амфотерными соединениями, что обусловлено наличием в их молекулах функциональных групп кислотного и основного характера. Поэтому α -аминокислоты образуют соли как со щелочами, так и с кислотами:



В водном растворе α-аминокислоты существуют в виде равновесной смеси биполярного иона, катионной и анионной форм молекул. Положение равновесия зависит от pH среды:



КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА БЕЛОК

При взаимодействии белка с отдельными химическими веществами возникают окрашенные продукты реакции, образование которых обусловлено наличием в молекуле белка той или иной аминокислоты или химической группировки. Поэтому так называемые цветные реакции на белки часто используют для установления белковой природы вещества, изучения аминокислотного состава различных природных белков, количественного определения белков, количественного определения в белке той или иной аминокислоты. Наиболее известными качественными реакциями на белки и аминокислоты являются: биуретовая, ксантопротеиновая, нингидриновая и реакция Фоля.

Цель раздела. Ознакомиться с качественными и количественными реакциями на белки и аминокислоты.

Биуретовая реакция на белки обусловлена наличием между аминокислотными остатками пептидных связей, которые в щелочной среде образуют с ионами меди окрашенные солеобразные комплексные соединения (красно-фиолетового или сине-фиолетового цвета).

Ксантопротеиновая реакция обусловлена присутствием в белке циклических аминокислот — фенилаланина, тирозина и триптофана, которые при взаимодействии с концентрированной азотной кислотой образуют нитропроизводные жёлтого цвета (реакция нитрования бензольного кольца).

Нингидриновая реакция является качественной реакцией на все α -аминокислот. При нагревании с избытком нингидрина аминокислота дегидрируется, декарбоксилируется с образованием CO_2 , NH_3 и альдегида, а нингидрин превращается в восстановленный нингидрин. Восстановленный нингидрин и аммиак затем конденсируются с образованием окрашенного соединения. Если аминокислота содержит свободную аминогруппу, образуется пигмент сине-фиолетового цвета.

Реакция Фоля обусловлена присутствием в белке аминокислот цистина и цистеина, содержащих слабосвязанную серу. При нагревании растворов белка со щёлочью эти аминокислоты разрушаются с образованием сульфида натрия; последний, взаимодействуя с уксуснокислым свинцом, образует бурый (или чёрный) осадок сульфида свинца. Серосодержащая аминокислота метионин более устойчива и при слабом щелочном гидролизе не разрушается.

Реакция Миллона является качественной на аминокислоту тирозин. При добавлении к раствору белка реактива Миллона белок выпадает в осадок, который при нагревании приобретает красный цвет. Реакция доказывает наличие в радикале тирозина фенольного кольца, способного образовывать ртутную соль динитротирозина. К раствору белка не следует добавлять

избыток реактива Миллона, так как он содержит азотную кислоту, которая при взаимодействии с белком может дать жёлтое окрашивание, маскируя реакцию Миллона.

Реакция Сакагучи - качественная реакция на аргинин. Аргинин, имеющий гуанидиновую группировку, в присутствии α -нафтола окисляется гипобромидом в щелочной среде с образованием продукта конденсации розово-красного цвета.

Реакция Паули открывает в белковых растворах и гидролизатах аминокислоты гистидин и тирозин. При взаимодействии кислого раствора сульфаниловой кислоты с нитритом калия происходит реакция диазотирования и образуется диазобензолсульфоновая кислота. При реакции диазобензолсульфоновой кислоты с гистидином (или тирозином) образуется комплексное соединение вишнёво-красного цвета.

Реакция Адамкевича является специфической реакцией на триптофан и используется для обнаружения его в белках. Триптофан в кислой среде вступает в реакцию с глиоксиловой кислотой (альдегидами), образуя окрашенные в красно-фиолетовый цвет продукты конденсации.

Оснащение работы:

Биоматериал	Приборы и оборудование	Реактивы
Белок (свежий яичный ¹ или растительный белок)	Штативы для пробирок; пробирки (1, 5, 10 мл); мерные пипетки (1 – 2 и 5 мл); водяная баня; спиртовка; термостат.	Дистиллированная вода; раствор NaOH (10%, 30%); раствор CuSO ₄ (2%); азотная кислота (конц.); раствор нингидрина (0,25%) в смеси этиловый спирт: ацетон (1:1); раствор уксуснокислого свинца (5%); 0,01% растворы аминокислот: тирозина, аргинина, гистидина; реактив Миллона ² ; α -нафтол (0,2% спиртовой раствор); гипобромид натрия (0,2%); мочевины (40%); сульфаниловая кислота (1%); соляная кислота (5%); нитрит калия (0,5%); карбонат натрия (10%); серная кислота (конц.); ледяная уксусная кислота.

¹ Белок от 1 куриного яйца растворяют в 250 мл воды, фильтруют через слой марли и хранят в холодильнике.

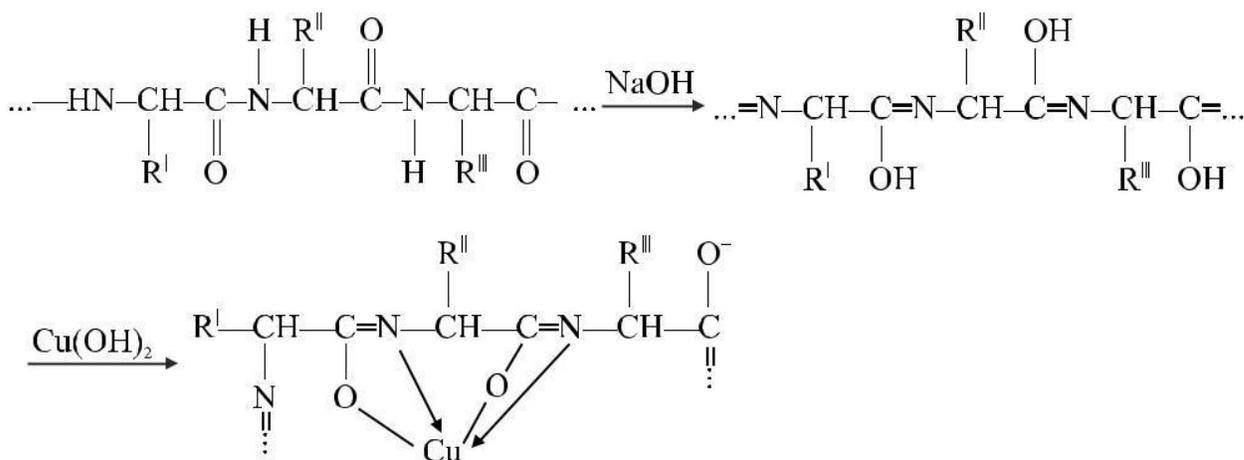
² В 60 мл конц. HNO_3 ($\rho = 1,40 \text{ г/мл}$) растворяют 40 г ртути при комн. температуре, помещают в тёплую водяную баню до прекращения выделения бурых паров и перемешивают. Затем добавляют 120 мл H_2O и полученный раствор разбавляют водой 1:1.

Пошаговое проведение работы:

Работа 1. Биуретовая реакция.

1. В пробирку наливают 2 мл раствора яичного белка.
2. Добавляют 1 мл раствора 10 % NaOH .
3. По каплям добавляют 2 % раствора CuSO_4 .

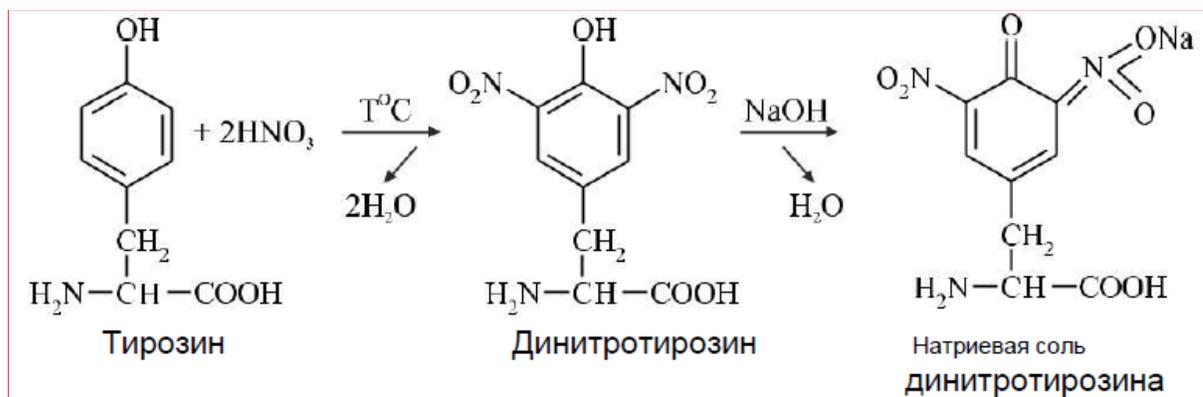
Сначала образуется бледно-голубой осадок, который в присутствии белка растворяется и окрашивает раствор в фиолетовый цвет.



Работа 2. Ксантопротеиновая реакция

1. В пробирку наливают 2 мл раствора белка.
2. Добавляют несколько капель конц. HNO_3 .
3. Нагревают.

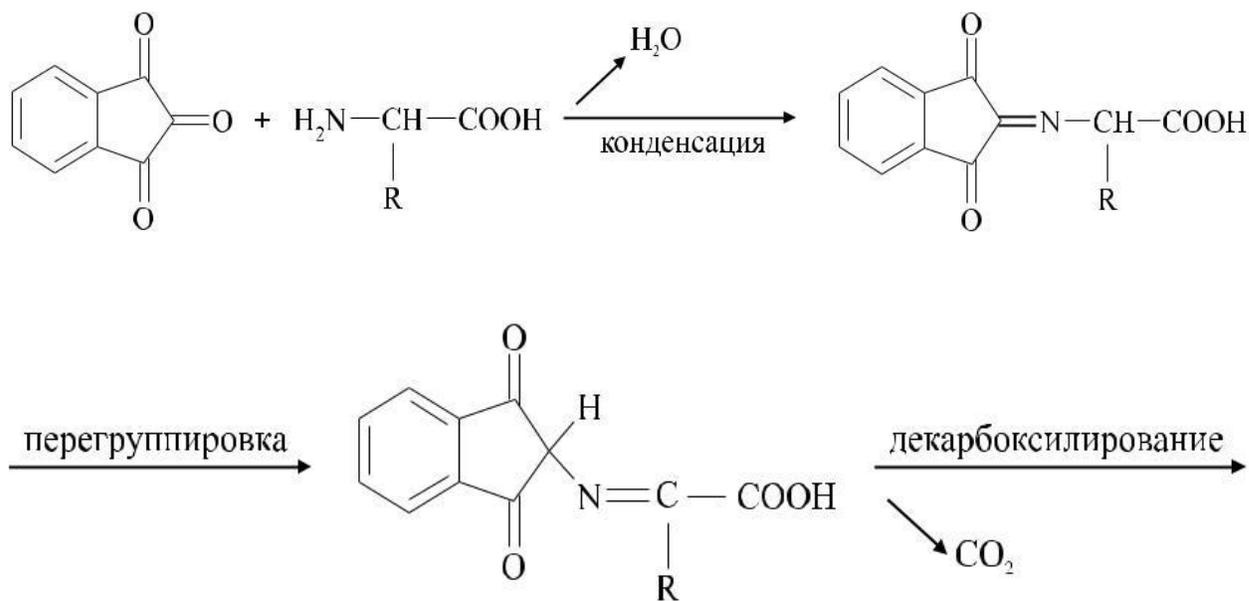
Выпадает осадок белка, который окрашивается в жёлтый цвет.

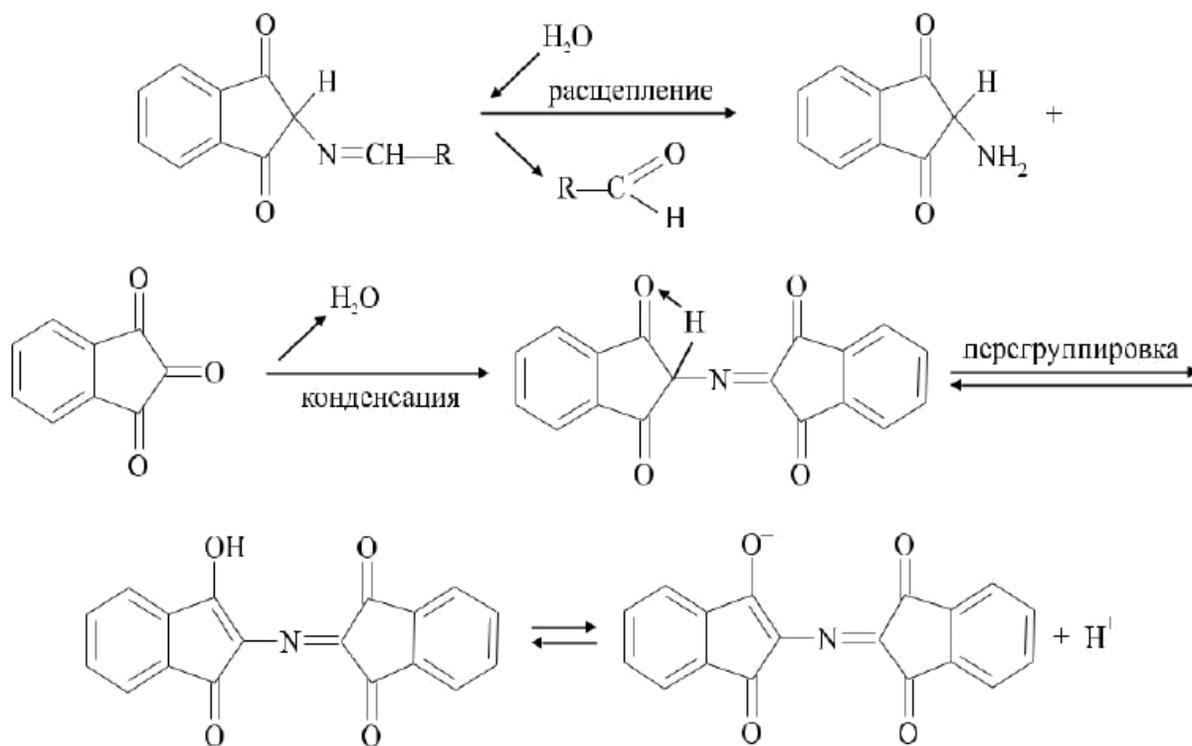


Работа 3. Нингидриновая реакция

1. В пробирку наливают раствор белка.
2. Добавляют несколько капель нингидрина.
3. Нагревают.

Отмечают, какие изменения произошли с раствором.

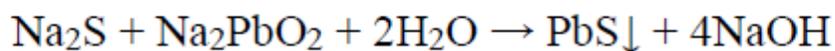
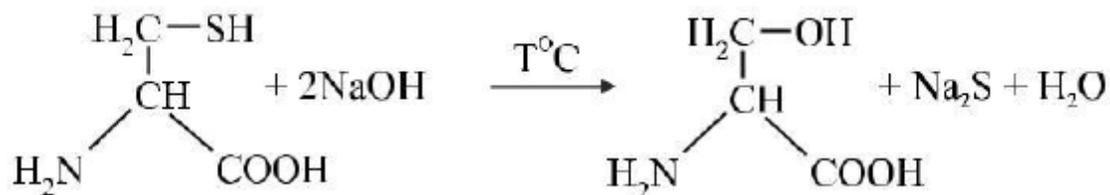




Работа 4. Реакция Фоля

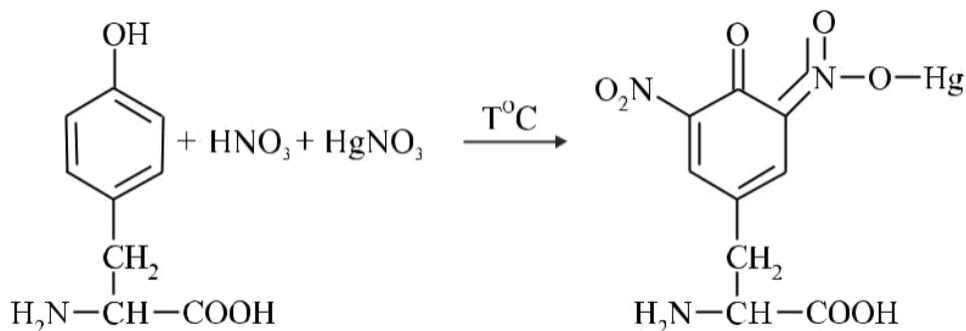
1. В пробирку вносят 5 капель раствора белка.
2. Добавляют 5 капель 30% раствора едкого натра.
3. Прибавляют 1 каплю 5% раствора уксуснокислого свинца.
4. Смесь нагревают до кипения и оставляют при комнатной температуре на несколько минут.

Наблюдают появление осадка бурого (или чёрного) цвета.



Работа 5. Реакция Миллона

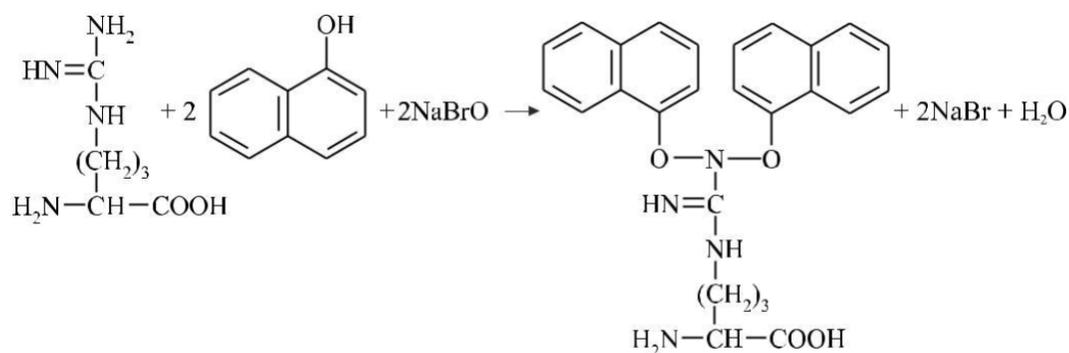
1. В пробирку вносят 1 мл 0,01% раствора тирозина.
 2. Добавляют 0,5 мл реактива Миллона, тщательно перемешивают.
- Через 10 минут раствор окрашивается в красный цвет.



Ртутная соль динитротирозина

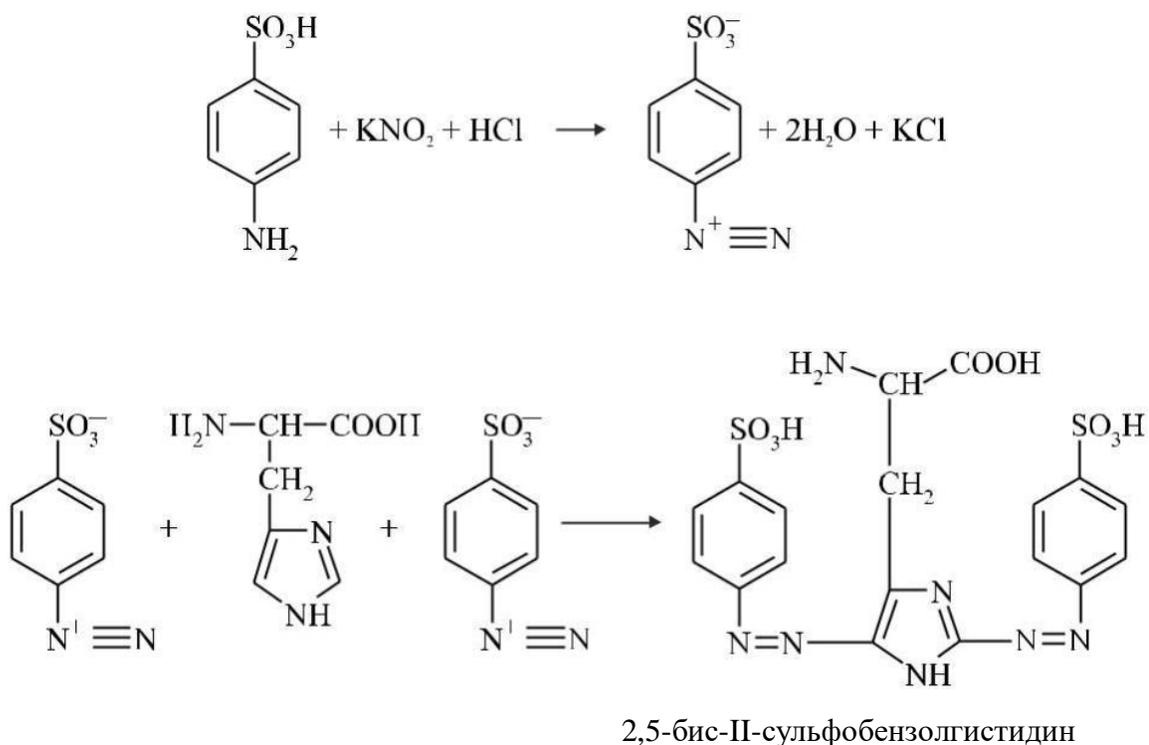
Работа 6. Реакция Сакагучи

1. В пробирку вносят 1 мл яичного белка.
2. Добавляют 1 мл 10% раствора щелочи и 3 капли раствора α -нафтола.
3. Тщательно перемешивают и добавляют 3 капли раствора гипобромида натрия.
4. Перемешивают, для стабилизации быстро развивающегося красного окрашивания немедленно быстро добавляют 1 мл 40 % раствора мочевины.



Работа 7. Реакция Паули

1. В две пробирки наливают по 1 мл 1% раствора сульфаниловой кислоты в 5% растворе соляной кислоты.
2. Добавляют по 2 мл 0,5 % раствора нитрита калия и сильно встряхивают пробирки.
3. Затем быстро в первую пробирку наливают 2 мл 0,01% раствора гистидина, во вторую — 2 мл 1 % раствора яичного белка.
4. Пробирки тщательно перемешивают.
5. Добавляют в обе пробирки по 6 мл 10% раствора карбоната натрия. Развивается интенсивная вишнёво-красная окраска.

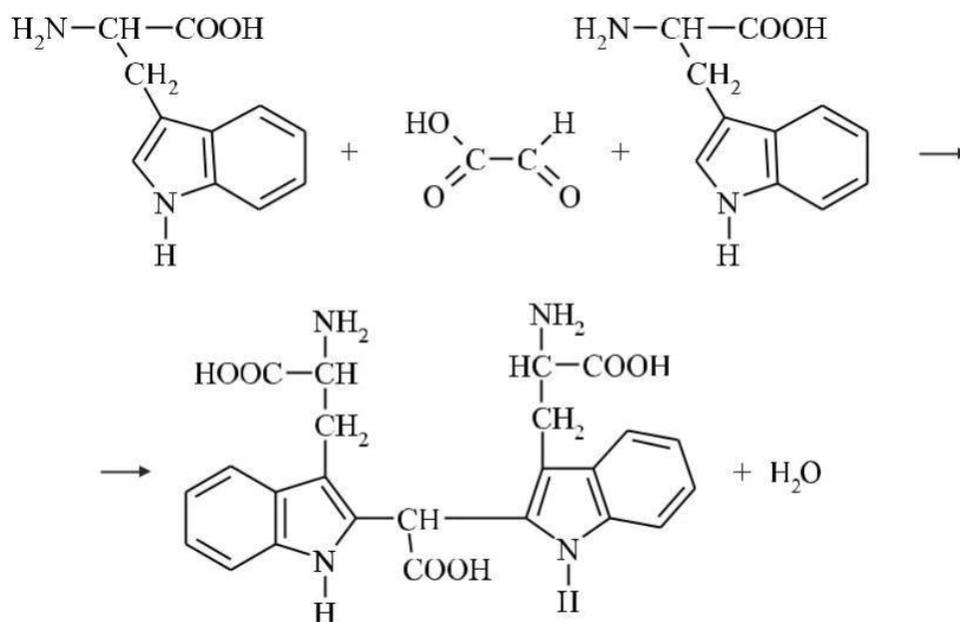


Работа 8. Реакция Адамкевича

1. В пробирку наливают 1 мл 1% раствора яичного белка.
2. Добавляют 0,5 мл ледяной уксусной кислоты, которая содержит небольшое количество глиоксиловой кислоты.

3. Полученную смесь вначале нагревают, а затем охлаждают.
4. Осторожно по стенке по каплям, чтобы жидкости не смешивались, добавляют 1 мл концентрированной серной кислоты.

Через 10 минут на границе раздела двух слоёв наблюдается образование красно-фиолетового кольца.



Результаты работы рекомендуются оформлять в виде таблицы:

№	Название реакции	Применяемые реактивы	Окраска продукта	Химизм реакции
1				
2				

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ

Для количественного определения белков применяют физические, биологические и химические методы.

Из физических методов наибольшее распространение получили три: рефрактометрический — по показателю преломления белковых растворов, спектрофотометрический — по поглощению в ультрафиолетовой области

спектра, полярографический — по кривым, показывающим зависимость между силой тока и напряжением, приложенным к системе, содержащей белок.

Для экспрессивного установления содержания белка широко используется прямая спектрофотометрия образцов при определённых длинах волн. Наибольшей известностью пользуется метод, основанный на измерении оптической плотности образца при 280 и 260 нм, предложенный Варбургом и Христианом. Однако этим методом можно лишь ориентировочно определить концентрацию белков, потому что они между собой могут сильно отличаться содержанием ароматических аминокислот, обуславливающих экстинкцию при 280 нм.

Биологические методы применимы только к белкам, обладающим ферментативной и гормональной активностью. Измеряя степень биологической активности препарата, можно составить представление о содержании в нем белка. Этот метод не даёт абсолютных результатов.

Химические методы определения белков разнообразны. Наиболее простым химическим методом является количественное определение общего или белкового азота. Умножая величину процентного содержания общего азота на коэффициент 6,25 (среднее содержание азота в белках 16 %, отсюда $100 : 16 = 6,25$), получают данные о содержании сырого белка. Однако способ условен, так как не даёт абсолютных результатов.

Самым распространённым химическим методом количественного определения белка является фотоколориметрический метод. Он основан на измерении интенсивности цветных реакций, развивающихся при взаимодействии белков с тем или иным специфическим реагентом.

Количественное определение общего белка по биуретовой реакции.
Белки сыворотки крови при взаимодействии с сернокислой медью в

щелочной среде образуют за счёт своих пептидных связей комплексные соединения с ионами меди фиолетового цвета. Интенсивность окрашивания раствора находится в прямой зависимости от концентрации в нем белка.

Диализ белка. Метод диализа основан на способности низкомолекулярных веществ диффузно проникать через полупроницаемые мембраны, а макромолекул — не проникать. Белки, являясь высокомолекулярными коллоидными веществами, не диффундируют через полупроницаемые мембраны (например, коллодиевую или целлофановую плёнку). Это свойство белков лежит в основе очистки их от низкомолекулярных примесей.

Высаливание белка — обратимая реакция осаждения белков из растворов с помощью больших концентраций нейтральных солей (NaCl, Na₂SO₄, MgSO₄, (NH₄)₂SO₄ и др.). При высаливании происходит дегидратация макромолекул белка и устранение заряда. На процесс высаливания влияет ряд факторов, таких как гидрофильность белка, его относительная молекулярная масса, заряд. Вследствие этого для высаливания различных белков требуется разная концентрация одних и тех же солей.

Глобулины осаждаются в полунасыщенном растворе сульфата аммония, а альбумины — в насыщенном растворе сульфата аммония.

Осаждение белков. Белок, находящийся в растворе, способен при определённых условиях выпасть в осадок. Это его свойство используется для обнаружения белка в исследуемом материале и для выделения его в чистом виде. Методы осаждения можно разделить на обратимые (высаливание нейтральными солями, действие спиртов) и необратимые, которые приводят к разрушению нативной конформации белка, т. е. денатурации. Осаждение белков при нагревании

Осаждение белков при нагревании характерно почти для всех белков (исключение составляет желатин). Особенно легко и более полно происходит осаждение белка в слабокислой среде. В нейтральной и сильнокислой среде осаждение белков идёт значительно хуже, а в щелочной среде вовсе не наблюдается. Тепловая денатурация в начальной стадии ведёт к региоселективным изменениям конформации, которые могут быть обратимыми. На последующей стадии неконтролируемая агрегация ведёт к образованию неупорядоченного клубка.

Осаждение белков концентрированными минеральными кислотами. Многие белки денатурируют при сильном подкислении (рН 2–3). В этих условиях практически все диссоциирующие группы белка имеют одноименный заряд. Взаимное отталкивание одноименных зарядов вызывает разрыв слабых связей, в результате чего нарушается нативная конформация. Минеральные кислоты вызывают дегидратацию белковых молекул, а также способны к образованию комплексных солей. Однако необходимо учитывать, что некоторые белки достаточно устойчивы в сильно кислой среде. Например, при рН 2 стабильны гистоны, протамины, лизоцим, а у пепсина при рН 1,5–2,2 активность максимальна.

Осаждение белков органическими кислотами. Органические кислоты, такие как трихлоруксусная, сульфосалициловая, вызывают дегидратацию и денатурацию белковых молекул. Для этих кислот характерен сложный механизм денатурации, включающий как непосредственное воздействие на водородные связи, так и блокирование полярных группировок. Сульфосалициловая и трихлоруксусная кислоты являются чувствительными и специфическими реактивами на белок, трихлоруксусную кислоту используют для полного осаждения белков из биологических жидкостей, например, сыворотки крови.

Осаждение белков солями тяжёлых металлов. Соли тяжёлых металлов (меди, ртути, цинка, серебра, свинца) осаждают белки в результате образования комплексных соединений. Осадок денатурированного белка в избытке солей некоторых тяжёлых металлов (ацетата свинца, сульфата меди) растворяется. Это связано с тем, что избыток ионов этих металлов, адсорбируясь на поверхности белковых частиц, вызывает перезарядку белкового комплекса, в результате чего он переходит в раствор. Этот процесс называется адсорбционной пептизацией. Способность белка прочно связывать ионы тяжёлых металлов в виде нерастворимых в воде осадков используется как противоядие при отравлениях солями ртути, меди, свинца и др. Сразу после отравления следует принимать молоко или яйца, пока ещё эти соли находятся в желудке и не успели всосаться. Вслед за этим необходимо вызвать рвоту, чтобы удалить яд из организма.

Осаждение белков органическими растворителями. Органические растворители осаждают белки из водных растворов вследствие дегидратации белковых молекул.

Оснащение работы:

Биоматериал	Приборы и оборудование	Реактивы
Сыворотка крови; яичный белок	Микропипетки, пипетки ёмкостью 1 мл с делениями и 5 мл, фотоэлектроколориметр (ФЭК), кювета с толщиной слоя 1 см, штатив с пробирками, диализатор (или стеклянный стакан на 0,5 л), целлофановые мешочки ¹ , стеклянные палочки, резиновые колечки, фильтровальные воронки, фильтры бумажные	Дистиллированная вода; 1% раствор яичного белка; биуретовый реактив (10% раствор гидроксида натрия и 1% раствор сульфата меди); рабочий раствор, приготовленный из основного раствора; 0,9 % раствор хлористого натрия; стандартный раствор альбумина (из человеческой или бычьей сыворотки); 10% раствор азотной кислоты; 1% раствор ацетата свинца; 1% раствор нитрата серебра; сульфат аммония (кристаллический и насыщенный раствор); 1% раствор уксусной кислоты; насыщенный раствор хлорида натрия; 10% раствор гидроксида натрия; концентрированная азотная, серная, соляная кислоты; 5%

		раствор трихлоруксусная кислота; 20% раствор сульфосалициловой кислоты; этиловый спирт; ацетон.
--	--	---

¹ Вырезают из целлофана круг диаметром 9–12 см. Складывают его в форме мешочка, вставляют в отверстие стеклянную трубку, длиной 5–6 см и диаметром- 0,5–0,8 см, так, чтобы верхний конец трубки выступал из мешочка на 2–3 см, а нижний был погружен внутрь на одну треть мешочка. Мешочек туго завязывают на трубке шнурком. До работы диализный мешочек следует сохранять наполненным водой и погруженным в воду. Перед работой воду выливают и с помощью воронки с оттянутым концом вливают в мешочек солевой раствор- белка (не более половины объёма мешочка).

Пошаговое проведение работы:

Работа 9. Количественное определение общего белка сыворотки крови по биуретовой реакции

1. В пробирку вливаем 0,1 мл сыворотки крови.
2. Прибавляют 5,0 мл рабочего раствора биуретового реактива, смешивают, избегая образования пены.
3. Через 30 минут измеряют оптическую плотность раствора на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волн 540–560 нм (зелёный светофильтр) против контроля.
4. Одновременно ставят контроль. К 0,1 мл 0,9 % раствора хлористого натрия прибавляют 5 мл рабочего биуретового реактива.
5. Далее обрабатывают как опыт.
6. Расчёт ведут по калибровочному графику. Для его построения из стандартного 10 % раствора альбумина готовят рабочие стандартные растворы, как указано в таблице 1.
7. Из каждого разведения берут по 0,1 мл рабочего раствора и прибавляют по 5 мл рабочего биуретового реактива.
8. Через 30–60 минут измеряют оптическую плотность на ФЭКе, как в опыте, против контроля.
9. По полученным данным строят калибровочный график.

Норма — 6,5–8,5 % белка.

Таблица 1. Состав смесей для построения калибровочного графика

Стандартный раствор белка, мл	0,9% раствор хлористого натрия, мл	Содержание белка в пробе, г	Концентрация белка (%)
0,4	0,6	0,04	4
0,6	0,4	0,06	6
0,8	0,2	0,08	8
1,0	—	0,10	10

Примечание. Содержание белка в стандартном растворе должно быть не меньше 7%. При содержании белка в сыворотке больше 10% сыворотку разводят физиологическим раствором, а результаты умножают на коэффициент разведения.

Работа 10. Диализ солевого раствора белка

1. Вначале с помощью биуретовой реакции (см. работу 1) определяют, содержит ли исследуемый раствор белок.

2. Целлофановый мешочек наполняют на одну треть объёма 1% раствором исследуемого белка.

3. Мешочек помещают в диализатор, заполненный дистиллированной водой, зажимая у верхнего края двумя стеклянными палочками, которые скреплены резиновыми колечками.

4. Через 48 часов с диализатором (наружная жидкость) и используемой для диализа дистиллированной водой проводят реакцию на обнаружение хлоридов.

5. Готовят две пробирки, в одну из них наливают 1 мл диализата, в другую — 1 мл дистиллированной воды.

6. Затем добавляют по 1 капле 10% раствора азотной кислоты и 1% раствора нитрата серебра.

7. В пробирке, содержащей диализат, выпадает белый осадок, а в пробирке с дистиллированной водой осадка нет. При диализе солевого

раствора белка хлориды проникли в диализат через полупроницаемую мембрану.

8. Для проверки содержания белка в одну пробирку наливают 3 мл диализата, в другую — 3 мл диализируемой жидкости, затем в обе пробирки добавляют по 1 мл 10% раствора гидроксида натрия и по 1–2 капли 1% раствора сульфата меди (проводят биуретовую реакцию). По изменению окраски в пробирке с диализируемой жидкостью делают вывод о том, что белок не проникает через полупроницаемую мембрану.

Работа 11. Разделение альбуминов и глобулинов яичного белка методом высаливания

1. В пробирку вливают 1–2 мл яичного белка.

2. Приливают равный объем насыщенного раствора сульфата аммония и перемешивают. Получается полунасыщенный раствор сульфата аммония, в котором выпадает осадок глобулина.

3. Через 5 минут осадок отфильтровывают. В фильтрате остаётся другой белок — яичный альбумин.

4. Для высаливания альбумина к фильтрату добавляют кристаллический сульфат аммония до полного насыщения, т. е. пока новая порция соли остаётся нерастворённой.

5. Выпавший осадок альбумина отфильтровывают.

Работа 12. Осаждение белков при нагревании

1. В пять пронумерованных пробирок наливают по 2 мл 1% раствора яичного белка.

2. Первую пробирку нагревают до кипения. Наблюдают образование осадка.

3. Во вторую пробирку добавляют 0,1 мл 1% раствора уксусной кислоты и нагревают до кипения. Выпадает хлопьевидный осадок. Осаждение идёт быстрее, чем в первом случае, вследствие того, что частицы белка теряют заряд, потому что рН раствора приближается к изоэлектрическому состоянию.

4. В третью пробирку добавляют 0,5 мл 10% раствора уксусной кислоты и нагревают до кипения. Осадок не образуется даже при кипячении, т. к. молекулы белка приобретают положительный заряд, что повышает их устойчивость.

5. В четвертую пробирку добавляют 0,5 мл 10% раствора уксусной кислоты, 0,5 мл насыщенного раствора хлорида натрия и нагревают. Наблюдают появление осадка. Его образование обусловлено тем, что белок при взаимодействии с ионами хлорида натрия теряет свой заряд.

6. В пятую пробирку добавляют 0,5 мл 10% раствора гидроксида натрия. При кипячении осадок не образуется, т. к. в щелочной среде увеличивается отрицательный заряд белка.

Работа 13. Осаждение белков концентрированными минеральными кислотами

1. В три сухие пробирки наливают по 1 мл концентрированных азотной, серной, соляной кислот.

2. Затем, наклонив каждую пробирку, осторожно по стенке пробирки прикапывают по 0,5 мл раствора белка. На границе раздела двух жидкостей образуется осадок в виде кольца.

3. Содержимое пробирок перемешивают.

В пробирках с соляной и серной кислотами осадки растворяются, в пробирке с азотной кислотой осадок не исчезает.

Работа 14. Осаждение белков органическими кислотами

1. В две пробирки наливают по 2 мл раствора белка.
 2. Добавляют в первую — 0,5 мл 5% раствора трихлоруксусной кислоты.
 3. Во вторую — 0,5 мл 20% раствора сульфосалициловой кислоты.
- В обоих случаях наблюдают выпадение осадка белка.

Работа 15. Осаждение белков солями тяжёлых металлов

1. В три пробирки наливают по 1 мл яичного белка.
2. Добавляют по 1–2 капли: в первую — 1% раствора сульфата меди, во вторую — 1% раствора ацетата свинца, а в третью — 1% раствора нитрата серебра.
3. Во всех пробирках образуются осадки, нерастворимые в воде.
4. Затем добавляют в пробирки соответственно по 5–10 капель растворов сульфата меди, ацетата свинца, нитрата серебра.
5. В первых двух пробирках наблюдают растворение осадков.
6. В третьей пробирке в избытке нитрата серебра растворение осадка не происходит.

Работа 16. Осаждение белков органическими растворителями

1. В две пробирки наливают по 1–2 мл раствора яичного белка.
2. Добавляют в первую — 1–2 мл этилового спирта, во вторую — ацетона. Растворы в обеих пробирках становятся мутными.
3. Затем в обе пробирки добавляют по 1 мл насыщенного раствора хлорида натрия.

Через некоторое время наблюдают выпадение осадка белка.

Вывод. Указать особенности проведённых реакций и объяснить, почему белки способны вступать в различные качественные и количественные реакции.

Вопросы и задания для самоконтроля:

1. Чем обусловлена способность белков вступать в разнообразные качественные реакции?
2. Для решения каких задач на практике используют качественные реакции на белки и аминокислоты?
3. Какие качественные реакции из изученных могут проходить как при участии белков, так и отдельных аминокислот?
4. Какие органические вещества, помимо белков, могут вступать в биуретовую реакцию?
5. Какие органические вещества, помимо белков и аминокислот, могут вступать в ксантопротеиновую реакцию?
6. Все ли аминокислоты способны взаимодействовать с нингидрином с образованием окрашенного соединения?
7. Какие аминокислоты при взаимодействии с нингидрином образуют соединение, окрашенное не в сине-фиолетовый, а в жёлтый цвет?
8. Почему серосодержащая аминокислота метионин не вступает в реакцию Фоля?
9. На чем основаны цветные реакции на белки и каково их практическое значение?
10. Какой качественной реакцией можно определить α -аминокислотный состав белка? Приведите химизм этого процесса.
11. Какие факторы влияют на растворимость белков и их стабильность в растворе?

12. Почему при нагревании в слабокислой или слабощелочной среде белок легко выпадает в осадок?

13. На каких свойствах белка основаны реакции осаждения и каково их практическое применение?

14. При добавлении к водному раствору белков нейтральных солей в высоких концентрациях белок выпадает в осадок. Как называется это явление? Почему добавление солей в высоких концентрациях приводит к понижению растворимости белка?

3.2 ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ФЕРМЕНТОВ. БИОХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ И ФУНКЦИИ СЛЮНЫ

О присутствии того или иного фермента в тканях или биологических жидкостях судят по появлению продуктов превращения субстрата под действием, соответствующего энзима.

Основными свойствами биологических катализаторов являются их высокая активность, термолабильность, субстратная специфичность, зависимость активности от температуры, водородного показателя среды, присутствия активаторов и ингибиторов.

Слизистая оболочка полости рта является первым физиологическим барьером для большинства экзогенных антигенов, при этом состояние местного иммунитета ротовой полости в значительной степени определяет эффективность противoinфекционной защиты организма. Исследование состава и свойств слюны, гингивальной жидкости может быть объективным критерием в оценке тяжести и прогноза заболеваний тканей полости рта и эффективности их терапии.

Цель раздела: изучить качественные реакции и свойства ферментов полости рта и других объектов исследования: специфичность действия, термолабильность, влияние рН среды, активаторов и ингибиторов на скорость ферментативных реакций.

Ферментный гидролиз крахмала под действием амилазы. При участии амилазы крахмал подвергается последовательному гидролитическому расщеплению с образованием промежуточных продуктов распада – декстринов. Их легко обнаружить по образованию окрашенных продуктов с раствором йода.

Продукт реакции	Окрашивание с йодом
Крахмал	Синее
Растворимый крахмал	Синее
Амилодекстрины	Сине-фиолетовое
Эритродекстрины	Красно-фиолетовое или красное
Ахродекстрины	Буровато-жёлтое
Мальтодекстрины	Не дают
Мальтоза	Не даёт

Конечный продукт гидролиза - мальтоза – может быть обнаружен реакцией Троммера или Фелинга.

Влияние температуры на активность ферментов. Активность ферментов зависит от температуры. Температура, при которой наблюдаются максимальная скорость ферментативной реакции и сохраняются нативные свойства фермента, носит название оптимальной температуры. Температурный оптимум для большинства ферментов животных близок к температуре тела и лежит в пределах 37- 45°С, а для ферментов растений - между 50-60°С. При высоких температурах (60-70°С и выше) ферменты теряют свойства биологических катализаторов, что объясняется тепловой денатурацией белковой молекулы фермента (термолабильностью фермента). При понижении температуры ниже указанного оптимума активность фермента падает.

Влияние температуры на активность ферментов можно рассматривать на примере амилазы слюны, определяя степень расщепления крахмала (по

реакции продуктов с раствором йода) амилазой при различных температурных условиях.

Специфичность действия ферментов. Специфичность действия - одно из наиболее характерных свойств ферментов - проявляется в том, что каждый фермент действует на определённый субстрат (или группу субстратов).
Различают:

- абсолютную специфичность, когда фермент катализирует только одну реакцию превращения какого-либо вещества (например, уреазы катализирует только реакцию гидролиза мочевины до аммиака и диоксида углерода);

- групповую специфичность, когда энзим ускоряет реакции превращения группы сходных по строению субстратов (липазы, например, катализируют реакции гидролитического расщепления различных триглицеридов);

- стереохимическую специфичность, когда фермент катализирует реакцию расщепления или синтеза только одного из стереоизомеров, не воздействуя на другой (так, бактериальная аспартатдекарбоксилаза ускоряет реакцию отщепления диоксида углерода от L-аспарагиновой кислоты, но не от D-изомера).

Высокая специфичность ферментов обусловлена уникальной структурой их активных центров.

Специфичность действия амилазы и сахаразы. Амилаза катализирует реакцию гидролитического расщепления крахмала и не действует на дисахариды (сахарозу, мальтозу и другие), сахараза ускоряет гидролиз сахарозы, не расщепляя крахмал (или другие дисахариды).

Влияние pH среды на активность ферментов. Каждый фермент проявляет максимум каталитической активности в пределах довольно узкого

диапазона рН, называемого оптимумом рН. Зависимость активности фермента от рН среды обусловлена изменением пространственной конфигурации активных участков молекулы фермента вследствие изменения концентраций ионов водорода, что и приводит к изменению скорости ферментативной реакции. Оптимум рН для различных ферментов различен. Так, для пепсина оптимум рН равен 1,5-2,5, амилазы слюны – 6,8-7,0, трипсина – 7,5-8,5, панкреатической липазы – 7,0-8,5, каталазы – 6,8-7,0.

О влиянии рН на активность ферментов можно судить по расщеплению крахмала амилазой слюны при различных значениях рН.

Влияние активаторов и ингибиторов на активность ферментов.

Значительное влияние на активность ферментов оказывает присутствие в тканях ряда химических соединений. Одни из них повышают активность энзимов (активаторы), другие – подавляют ферментативную реакцию (ингибиторы). Например, ферментативная активность амилазы слюны повышается под влиянием хлорида натрия, панкреатической липазы – желчных кислот, пепсина – соляной кислоты и т.д. Из ингибиторов ферментов известны цианид-ионы (для некоторых "геминовых" ферментов), фосфорорганические соединения (для эстераз), ионы тяжёлых металлов – Cu^{2+} , Ag^+ , Hg^{2+} , Pb^{2+} (для большинства ферментов) и другие. Указанные действия активаторов и ингибиторов связаны в основном с влиянием этих веществ на структуру активного центра ферментов, что ведёт к изменению способности ферментов связывать субстрат (образовывать фермент-субстратные комплексы). Влияние активаторов и ингибиторов на активность ферментов удобно наблюдать на примере амилазы слюны, которая активируется хлоридом натрия и ингибируется сульфатом меди (II).

Оснащение работы:

Биоматериал	Приборы и оборудование	Реактивы
Амилаза слюны	Пробирки; штатив; термостат; водяная баня.	Дистиллированная вода; раствор крахмала (0,5%); раствор йода (0,1%) в йодиде калия; лёд; вытяжка из дрожжей; раствор сахарозы (1%); фосфатные буферные смеси; 0,2 М раствора дигидрофосфата; 0,2 М гидрофосфата натрия; NaCl (1%); CuSO ₄ (1%).

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ ОБНАРУЖЕНИЯ ФЕРМЕНТОВ

Пошаговое проведение работы:

Работа 17. Ферментный гидролиз крахмала под действием амилазы

1. Чистые, сухие десять пробирки, нумеруют (№1, ...10).
2. В №1 - 9 пробирки вносят по 2 мл воды.
3. Прибавляют по 2 капли 0,1% раствора йода в йодиде калия.
4. В №10 пробирку наливают 5 мл 0,5% раствора крахмала.
5. Прибавляют разный объем разведённой в 10 раз слюны.
6. Быстро перемешивают и 2 капли смеси вносят в первую пробирку с раствором йода.
7. Через 5-16 с (в зависимости от активности фермента) из №10 пробирки берут 2 капли раствора во №2 - 9 пробирки перемешивают и отмечают получаемое окрашивание.
8. При интервале времени наблюдается постепенный переход окраски растворов в пробирках от синей через красную (различных оттенков) до жёлтой (цвет раствора йода).
9. С №10 пробиркой проделывают реакцию Троммера*.
10. Отмечают появление краснокирпичного осадка оксида меди (I).

* *Примечание: соблюдать меры безопасности при работе с гидроксидом натрия и нагреванием. К 5 мл 0,5% раствора крахмала прибавляют разный объем разведённой в 10 раз слюны, 5 мл 10% раствора едкого натра и 3 мл 1% раствора сульфата меди. Дают постоять при комнатной температуре 15 минут. Затем осторожно нагревают до*

закипания. Появление красного окрашивания указывает на положительную реакцию Громмера.

ОБЩИЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ

Работа 18. Влияние температуры на активность ферментов

1. Чистые, сухие четыре пробирки, нумеруют (№ 1, 2, 3, 4).
2. Во все пробирки наливают по 10-12 капель 0,5% раствора крахмала.
3. №1 пробирку помещают в стакан со льдом.
4. №2 пробирку - в штатив при комнатной (18-20 °С) температуре.
5. №3 пробирку - в термостат при температуре 40-42°С.
6. №4 пробирку - в водяную баню при температуре 80-100°С.
7. В 12 других пробирок (нумеруют №1, ..., 12) наливают по 3 мл воды и по 2-3 капли 0,1% раствора йода в йодиде калия.
8. Через 5 мин в пробирки с крахмалом прибавляют по 10 капель разведённой в пять раз слюны.
9. Перемешивают и оставляют при указанных температурах.
10. Через каждые 1,5 мин (3 раза) отбирают по 1 капле содержимого пробирок с субстратом и ферментом.
11. Затем помещают в пробирки с раствором йода.
12. Наблюдают различную окраску продуктов при реакции с йодом, что обусловлено различной степенью гидролиза крахмала вследствие разницы в скоростях ферментативного катализа при указанных температурных условиях опыта.

Работа 19. Специфичность действия ферментов

1. Чистые, сухие две пробирки, нумеруют (№1, 2).
2. В две пробирки помещают по 5-6 капель 0,5% раствора крахмала.

3. В №1 пробирку добавляют 8-10 капель разведённой в 5 раз слюны (амилазу).
4. Во №2 пробирку прибавляют 8-10 капель вытяжки из дрожжей, содержащей фермент сахаразу.
5. Обе пробирки выдерживают 10 мин при комнатной температуре.
6. Прибавляют в них по капле 0,1% раствора йода в йодиде калия и отмечают окрашивание.
7. В две другие пробирки (№3, 4) помещают по 10-12 капель 1% раствора сахарозы.
8. В №3 пробирку добавляют 8-10 капель вытяжки из дрожжей.
9. В №4 пробирку добавляют 8-10 капель разведённой слюны.
10. После выдержки пробирок при комнатной температуре в течение 5 мин с их содержимым проводят реакцию Троммера (см. выше).

Действие ферментов в обоих опытах обнаруживается либо по исчезновению субстрата, либо по появлению продуктов его гидролиза. Убеждаются, что амилаза катализирует гидролиз крахмала (но не сахарозы), а сахараза - гидролиз сахарозы (но не крахмала).

Работа 20. Влияние рН среды на активность ферментов

1. Чистые, сухие семь пробирки, нумеруют (№1, ..., 7).
2. Во все пробирки помещают фосфатные буферные смеси с различными значениями рН.
3. Смешивают в определённых пропорциях 0,2 М растворы дигидрофосфата и гидрофосфата натрия.
4. В каждую пробирку добавляют по 10 капель 0,5% раствора крахмала.
5. Добавляют по 10 капель разведённой в 100 раз слюны.

6. Перемешивают и ставят в водяную баню (или термостат) при 38 – 40°C.

7. Через 5 мин из №4 пробирки берут каплю смесей и добавляют в заранее приготовленную пробирку с 2 мл воды и каплей 0,1% раствора йода в йодиде калия.

8. Эту реакцию повторяют затем через каждые 2 мин до тех пор, пока в капельной пробе не будет получено жёлтое или красно-жёлтое окрашивание (т.е. произойдёт полное расщепление крахмала).

9. После этого во все опытные пробирки прибавляют по 1 капле 0,1% раствора йода и перемешивают.

Наблюдают различное окрашивание смесей в соответствии с глубиной ферментативного гидролиза крахмала. Устанавливаем, при каком значении рН произошло наиболее полное расщепление крахмала (оптимум рН).

Работа 21. Влияние активаторов и ингибиторов на активность ферментов

1. Чистые, сухие три пробирки, нумеруют (№1, 2, 3).
2. Во все пробирки вносят по 10 капель разведённой в 5 раз слюны.
3. В №1 пробирку добавляют 8 капель воды и 2 капли 1% раствора хлорида натрия.
4. Во №2 - 10 капель воды.
5. В №3 - 8 капель воды и 2 капли 1 % раствора сульфата меди (II).
6. Перемешивают, прибавляют во все пробирки по 5 капель 0,5% раствора крахмала.
7. Оставляют при комнатной температуре.

8. Через каждые 5 минут (3 раза) в заранее приготовленные три пробирки с 2 мл воды, подкрашенной 2 каплями 0,1% раствора йода, отбирают по 2-3 капли содержимого каждой из опытных пробирок.

Наблюдают различия характера окраски в исследуемых случаях. Делают вывод об активности фермента в присутствии хлорида натрия и сульфата меди (II).

Вывод. Указать особенности проведённых реакций и объяснить, почему ферменты способны вступать в различные качественные реакции.

Вопросы и задания для самоконтроля:

1. Дайте определение ферментам. Каковы отличия ферментов от небиологических катализаторов?

2. Что следует понимать под терминами апофермент, простетическая группа, кофермент, холофермент?

3. Дайте понятие об активном центре фермента?

4. Что следует понимать под механизмом действия ферментов? Рассмотрите механизм действия амилазы, химотрипсина, лактатдегидрогеназы.

5. Перечислите факторы, влияющие на скорость ферментативной реакции.

6. Дайте определения понятиям: оптимум температуры, оптимум pH, активаторы, ингибиторы.

7. Что понимают под специфичностью действия ферментов? Приведите примеры.

8. По каким признакам можно судить о действии фермента?

9. На чем основаны методы количественного определения активности ферментов?

10. Что принимают за единицу активности фермента?

3.3 ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ И ПРИНЦИП МЕТОДА ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Иммуноферментный анализ (ИФА) (англ. *ELISA* - *enzyme-linked immunosorbent assay*) — лабораторный иммунологический метод качественного или количественного определения различных низкомолекулярных соединений, макромолекул, вирусов и пр., в основе которого лежит специфическая реакция антиген-антитело.

ИФА является одним из наиболее активно развивающихся направлений химической энзимологии. ИФА уникальная специфичность иммунохимической реакции (то есть антитела связываются исключительно с определёнными антигенами, и ни с какими другими) сочетается с высокой чувствительностью детекции ферментативной метки (вплоть до 10^{-21} моль в образце).

Чтобы понять, как устроен ИФА, необходимо разобраться в сути реакции «антиген-антитело».

Антиген — это чужеродное белковое соединение (молекула), попавшее в организм человека с бактериальной, вирусной или другой инфекцией. То есть вредитель. Частицы чужой крови также являются антигенами. В организме антигены способны вызывать иммунную реакцию, направленную на защиту целостности внутренней среды от чужеродных веществ. Поэтому наше тело синтезирует особые вещества — антитела (иммуноглобулины), способные соединяться с антигенами, связывая их в иммунный комплекс (этот процесс называется реакцией «антиген-антитело»). Такие иммунные комплексы легче распознаются и уничтожаются клетками иммунитета (рис. 1 и 2).

Выработку антител провоцируют сами же антигены, проникшие в организм человека. При вступлении в «битву» за здоровье организма антитела как бы помечают собой антигены, что при исследовании крови и видит лаборант. То есть в забранном биоматериале можно отследить не только наличие инфекции, но и ее следы уже после того, как организм полностью выздоровел.

При проведении анализа на ИФА врач клинической лабораторной диагностики может видеть следующие иммуноглобулины к антигенам:

- Иммуноглобулины М (IgM). Свидетельствуют о том, что инфекционный процесс в организме только набирает свою силу, т.е. инфицирование произошло совсем недавно;
- Иммуноглобулины G (IgG). Способствуют уничтожению антигенов через несколько дней после внедрения инфекции в организм человека. Иммуноглобулины G могут находиться в организме пациента достаточно долго, формируя иммунитет к определённому возбудителю;
- Иммуноглобулины E (IgE). Свидетельствуют о паразитарных инфекциях в организме и об атопических реакциях при аллергии.
- Иммуноглобулины A (IgA). В большом количестве содержатся в слизистых оболочках, защищая «подступы» к организму.

По их концентрации можно оценить, на какой стадии находится инфекционный процесс, а также узнать, болел ли когда-либо человек тем или иным недугом (например, краснухой или ветряной оспой).

Анализируемый биоматериал и особенности его забора. С помощью анализа можно установить этиологию болезни, стадию её развития, степень опасности для человека.

Основной биоматериал для проведения ИФА — это сыворотка крови: в лаборатории у пациента берут образец крови из вены, из

которого в дальнейшем удаляют форменные элементы, затрудняющие проведение анализа. В некоторых других случаях для анализа используется спинномозговая жидкость, околоплодные воды, мазки слизистых оболочек и т.д.

Для того чтобы избежать искажений в результатах, рекомендуется сдавать кровь натощак, а за две недели до исследования (если целью является диагностика хронических, скрыто протекающих инфекционных заболеваний) необходимо отказаться от приёма антибиотиков и противовирусных препаратов.

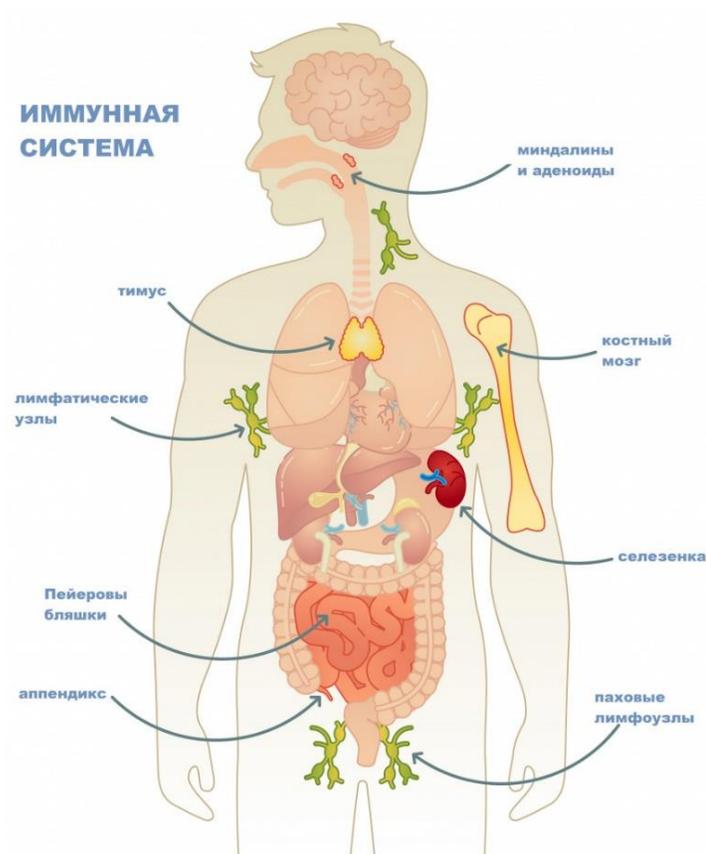


Рис. 1. Органы иммунной системы организма человека.

ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУНИТЕТ

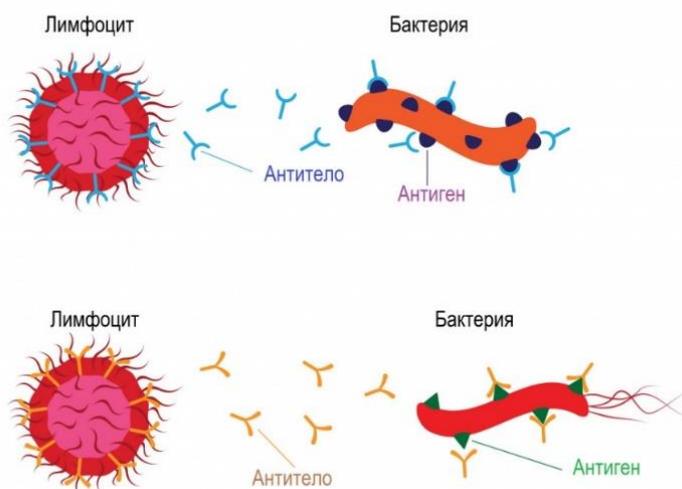


Рис. 2. Механизм обезвреживания инфекционных агентов лимфоцитами.

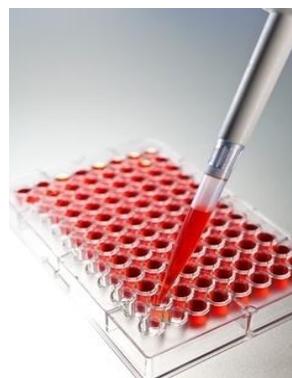
Сроки готовности результатов ИФА. При наличии необходимых реактивов и хорошей организации работы лаборатории результат анализа вы получите в течение 1–2 суток после забора крови. В некоторых случаях, при необходимости получения экстренного ответа, этот срок может быть сокращён до 2–3 часов.

Работа 22. Методика проведения иммуноферментного анализа

Для проведения диагностики необходимы ИФА-анализаторы (рис. 3) и наборы реагентов. Результаты анализа пациент получает в течение 1-2 суток, что позволяет как можно раньше назначить адекватную терапию.



а



б

Рис. 3. Иммуноферментный анализатор Immunochem-2200-4 (а) и термошейкер на 4 планшеты (б)

Виды и стадии ИФА

Постановка ИФА подразделяется на прямой (рис. 4а) и непрямой анализ (рис. 4б). В настоящее время в лабораториях чаще используют непрямую методику, так как она даёт более точные результаты.

В иммуноферментном анализе выделяют три стадии:

- Антигены фиксируются и связываются на поверхности лунки с немеченым антителом. Вначале в лунки вносится биоматериал, затем через 20-30 минут добавляют антитела. Через 1,5-2 часа образуется иммунный комплекс. Не связавшиеся антитела удаляют, используя специальный раствор;

- На втором этапе к иммунному комплексу добавляют меченные антитела. В течение 30 минут меченые антитела скрепляются с немечеными и образуется новый комплекс, который состоит из 2-х антител и антигена;

- На третьем этапе вносится фермент, в результате происходящей реакции «метка» преобразуется за 5-30 минут в окрашенную субстанцию. Посредством колориметрии вычисляется концентрация окрашенной части. Она всегда будет равна концентрации меченных антител. А их концентрация

всегда соответствует содержанию немеченых антител и соответственно концентрации антигенов.

При непрямом ИФА применяется двойной контроль, т.е. используется 2 разновидности антител. Это значительно повышает точность диагностики и чувствительность реакции.

Ферменты как реагенты в ИФА диагностике играют ведущую роль, и к их выбору для лаборатории предъявляется ряд стандартных требований. Основные из них:

- Высокая чувствительность и специфичность, позволяющие обнаружить «метку» с самой низкой концентрацией;
- Доступность. Лучшие ферментные препараты должны сохранять высокую активность на всём протяжении проведения анализа;
- Простота определения концентрации используемого при ИФА фермента.

Вывод. Высокая стабильность реагентов, простота методов регистрации, возможность создания каскадных систем усиления различных химических сигналов и многие другие достоинства метода ИФА способствуют его широкому внедрению в различные области медицины, сельское хозяйство, микробиологическую и пищевую промышленность, охрану окружающей среды, а также в научные исследования.

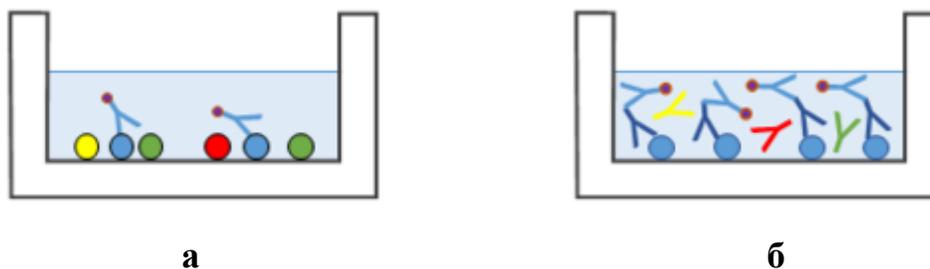


Рис. 4. Принципы прямого (а) и непрямого ИФА (б) [разноцветные круги — различные антигены из внесённой в лунку сыворотки; Y с лиловой точкой — антитела, меченные ферментом, обеспечивающим цветовую реакцию (конъюгат); синие круги — антиген,

**иммобилизованный на поверхности лунки;
Y, Y, Y, Y — антитела из внесённой в лунку сыворотки].**

3.4 ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ВИТАМИНОВ

Витамины — жизненно важные органические соединения, необходимые для человека и животных в ничтожных количествах, но имеющие огромное значение для нормального роста, развития и самой жизни. Витамины обычно поступают с растительной пищей и продуктами животного происхождения, поскольку они не синтезируются в организме человека и животных.

Суточная потребность в витаминах зависит от типа вещества, также от возраста, пола, состояния организма (период беременности, кормления ребёнка, физические нагрузки). При нормальном питании суточная потребность организма в витаминах удовлетворяется полностью. Недостаточное и неполноценное питание (несбалансированная диета у пожилых людей, недостаточное питание у неимущих людей, потребление полуфабрикатов) или нарушение процессов усвоения и использования витаминов могут быть причиной различных форм витаминной недостаточности, вплоть до авитаминозов. Избыточное количество других витаминов быстро выводится из организма с мочой.

Благодаря усилиям многих биохимиков и физиологов более чем за столетнюю историю витаминологии выделено около трёх десятков витаминов, изучены их состав и строение, физиологическое действие и в подавляющем большинстве случаев осуществлён химический синтез соответствующих препаратов.

В зависимости от растворимости различают жирорастворимые и водорастворимые витамины. Помимо этих двух главных групп, различают группу разнообразных химических веществ, некоторые из них частично синтезируются в организме человека и обладают витаминными свойствами. Эти вещества принято объединять в группу витаминоподобных: холин,

липоевая кислота, пангамовая кислота, оротовая кислота, инозит, убихинон, пара-аминобензойная кислота, карнитин, витамин U, комплекс ненасыщенных жирных кислот (витамин F).

Большинство витаминов является предшественниками коферментов, а некоторые витамины выполняют сигнальные функции (таблица 1).

Таблица 1. Витамины, их суточная потребность для человека, активная форма и биохимическая функция

Витамин	Сут. погр. (мг)	Активная форма витамина или кофермент	Биохимическая функция или тип катализируемой реакции
А, ретинол, антиксерофтальмический	2,7	Цис-ретиаль	Зрительный процесс, участие в росте и дифференцировке эпителиальной, нервной, костной тканей
D, кальциферол, антирахитический	0,01–0,025	1,25-диоксихолекальциферол	Основной гормональный регулятор обмена кальция и фосфора в костях
Е, токоферол, антистерильный	5,0	Активная форма неизвестна	Выполняет функции антиоксиданта (перенос электронов)
К, филлохинон	1,0	Активная форма неизвестна	Активирует факторы свертывания крови – II, VII, IX, X путём карбоксилирования остатков
В1, тиамин, антиневритный	1,2	ТПФ — тиаминпирозин	Окислительное декарбоксилирование α-кетокислот и перенос активного альдегида (транскетолаза)
В2, рибофлавин, витамин роста	1,7	ФАД — флавиноадениндинуклеотид ФМН — флавиномононуклеотид	Реакции переноса водорода, дыхание (дегидрогеназы)
В3, пантотеновая кислота, антидерматитный	3-5	НС-КоА — кофермент А	Реакции переноса ацильных групп (ацилтрансферазы)
В5 (РР), никотинамид, ниацин, антипеллагрический	18	НАД – никотинамидадениндинуклеотид НАДФ – никотинамидадениндинуклеотид-фосфат	Дыхание, реакции переноса водорода (дегидрогеназы)

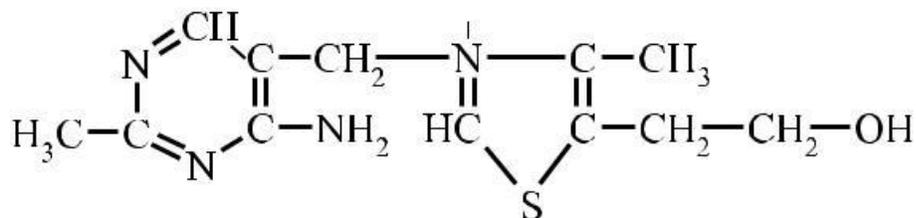
В ₆ , пиридоксин, пиридоксаль, пиридоксамин, антидерматитный	2	ПФ – пиридоксаль-фосфат	Трансаминирование и декарбоксилирование аминокислот
В ₁₂ , кобаламин, антианемический	0,003	Дезоксиаденозин (или метилкобаламин)	Метилирование гомоцистеина в метионин, превращение метилмалонил-КоА в сукцинил-КоА
В _с , фолиевая кислота, антианемический	1-2,2	Тетрагидрофолиевая кислота (ТГФК)	Реакции переноса одноуглеродных остатков (синтез нуклеотидов)
Н, биотин, антисеборейный	0,25	Биоцитин (Е-N – карбоксибиотинил-лизин	Реакции переноса СО ₂ , осуществляемые коферментами карбоксилаз
С, аскорбиновая кислота, антискорбутный	75	Активная форма неизвестна	Выполняет функции антиоксиданта, участвует в биосинтезе коллагена, катаболизме тирозина
Р, биофлавоноиды, рутин, капилляроукрепляющий	50	Активная форма неизвестна	Стабилизирует основное вещество соединительной ткани путём ингибирования гиалуронидазы: совместно с витамином С в окислительно-восстановительных процессах

Цель раздела: ознакомиться с качественными и количественными реакциями на витамины.

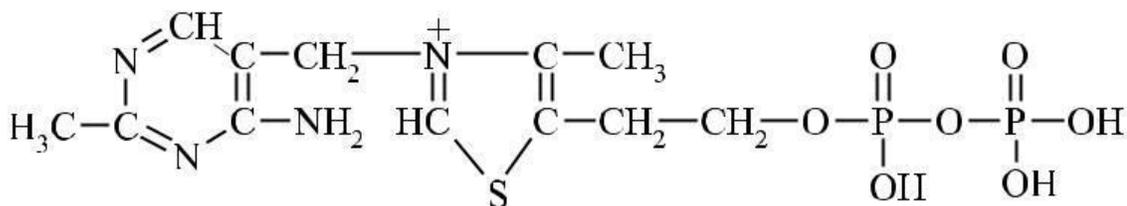
КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ВИТАМИНЫ

Для обнаружения витаминов в различных веществах или биологических жидкостях и определения их количества существуют качественные реакции, основанные на цветных реакциях.

Витамин В₁ - тиамин имеет бициклическую природу, состоит из пиримидинового и тиазольного кольца:



В животных тканях тиамин (В1) присутствует главным образом в виде кофермента — тиаминпирофосфата:



Тиаминпирофосфат является коферментом декарбоксилаз кетокислот. Тиаминпирофосфат катализирует также реакции переноса одноуглеродных фрагментов, будучи коферментом соответствующих ферментов.

Тиамин представляет собой мелкие бесцветные кристаллы горького вкуса, хорошо растворимые в воде. Растворы его в кислой среде устойчивы и выдерживают нагревание до высоких температур. В нейтральной и щелочной среде тиамин быстро разрушается.

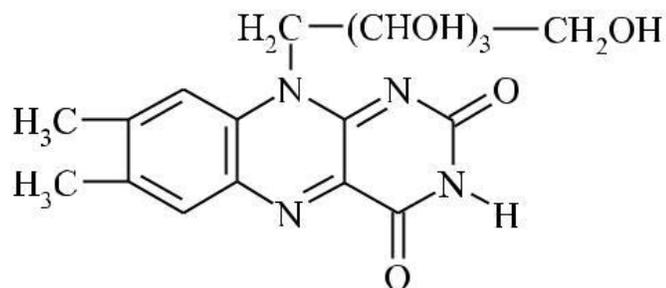
При авитаминозе тиамина развивается заболевание, получившее название полиневрит. Кроме человека, заболеванию подвержены птицы, кролики, собаки, крысы, морские свинки и многие другие животные.

Окисление витамина В₁ в щелочной среде осуществляют под действием гексациано-III-феррата калия в тиохром — пигмент жёлтого цвета, который в изобутиловом спирте даёт интенсивно синюю флюоресценцию.

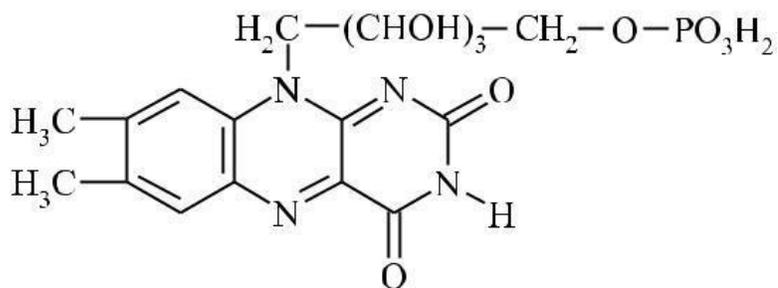
Диазореакция витамина В₁ в щелочной среде проводят с диазореактивом (смесь солянокислого или сернокислого раствора

сульфаниловой кислоты с раствором нитрита натрия, при наличии витамина В₁ образует сложное комплексное соединение оранжевого или красного цвета).

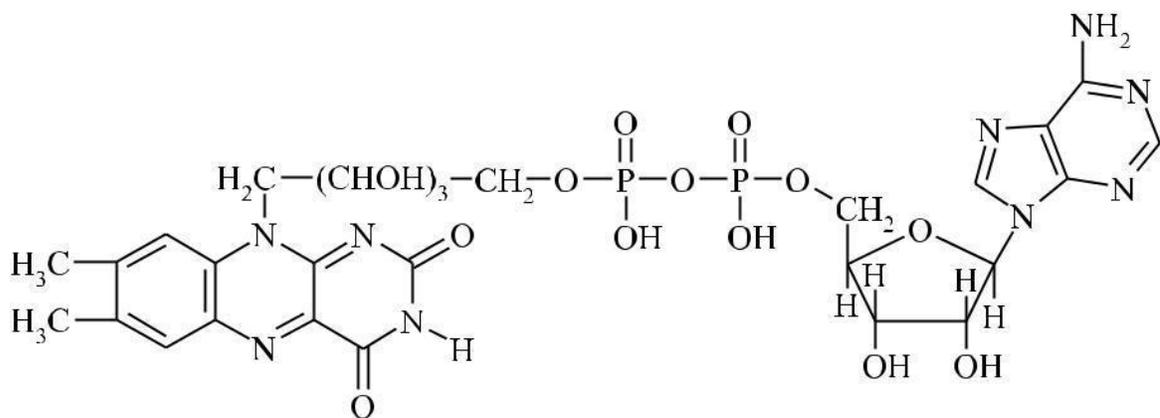
Витамин В₂ – рибофлавин составляет изоаллоксазин, в котором сочетаются бензольный, пиразинный, пиримидиновый циклы, в положении 9 имеется остаток пятиатомного спирта — рибитола:



Рибофлавин входит в состав двух родственных коферментов – флавинмононуклеотида (ФМН):



и флавинаденидинуклеотида (ФАД):



Эти коферменты функционируют в простетических группах ферментов дегидрогеназ. В катализируемых этими ферментами реакциях изоаллоксазиновое кольцо флавиновых нуклеотидов служит промежуточным переносчиком атомов водорода, отщепляющихся в ходе реакции от молекулы субстрата.

Рибофлавин химически неустойчив, легко разрушается при кипячении и на свету. Под действием света он распадается на рибитол и 6,7-диметилаллоксазин или люмихром. Рибофлавин легко окисляется и восстанавливается, наибольшей способностью присоединять атомы водорода обладают атомы азота, находящиеся в 1-м и 10-м положениях молекулы изоаллоксазина.

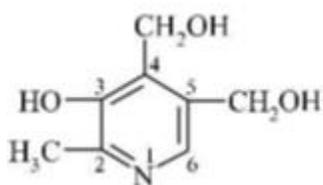
При авитаминозе рибофлавина приостанавливается рост, наблюдается выпадение волос, поражаются слизистые оболочки, утомляется зрение, нарушается нормальный синтез гемоглобина.

Образующийся при добавлении металлического цинка к концентрированной соляной кислоте водород восстанавливает жёлтый рибофлавин сначала в родофлавин красного цвета, затем в бесцветный лейкофлавин.

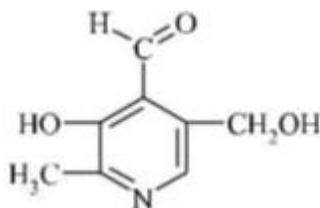
Витамина В₆ – пиридоксин включает три родственных соединения: пиридоксол, пиридоксаль, пиридоксамин, которые в биологических системах легко превращаются друг в друга. Термином «витамин В₆» обозначают все

три производных 3-оксипиридина, которые отличаются друг от друга природой замещающей группы в положении 4 пиридинового ядра. Активной формой витамина В₆ является пиридоксальфосфат и пиридоксаминфосфат.

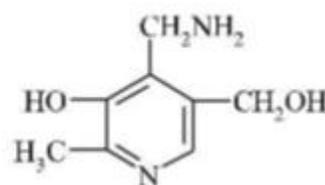
Пиридоксальфосфат представляет собой прочно связанную простетическую группу ферментов, катализирующих реакции с участием аминокислот. К наиболее распространённым и хорошо изученным реакциям относятся реакции переаминирования, в которых аминогруппа α-аминокислоты обратимо переносится на α-углеродный атом α-кетокислоты. В результате реакций переаминирования, катализируемых аминотрансферазами, прочно связанный с апоферментом пиридоксальфосфат служит промежуточным переносчиком аминогруппы от её донора α-аминокислоты к акцептору α-кетокислоте.



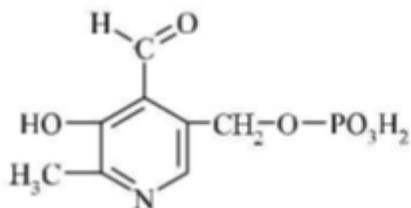
Пиридоксол



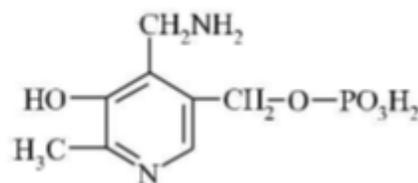
Пиридоксаль



Пиридоксамин



Пиридоксальфосфат



Пиридоксаминфосфат

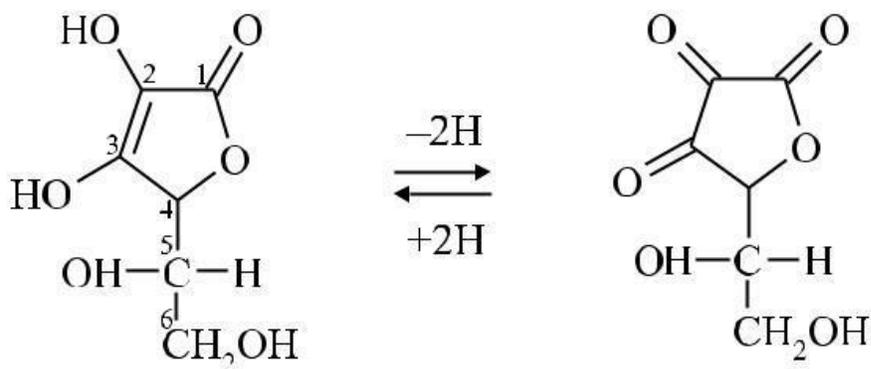
Из трёх названных выше веществ, образующих пиридоксиновый комплекс, наиболее изучен пиридоксол, который представляет собой бесцветные кристаллы с температурой плавления 160°C, горькие на вкус,

хорошо растворимые в воде и спирте. Растворы пиридоксола устойчивы к нагреванию с кислотами и щелочами, но быстро теряют активность под действием света.

Отсутствие в пище витамина В₆ сопровождается резким нарушением обмена белков, липидов, развивается атеросклероз, различного рода дерматиты, нарушается кроветворение.

Реакция витамина В₆ с хлоридом железа (III) проявляет красный цвет вследствие образования соли типа фенолята железа.

Витамин С (L-аскорбиновая кислота) представляет собой γ-лактон 2,3-дегидрогулоновой кислоты:



Обе гидроксильные группы имеют кислотный характер, в связи с чем, при потере протона соединение может существовать в форме аскорбатина. Аскорбиновая кислота содержит два асимметричных атома углерода в 4-м и 5-м положениях, что даёт возможность образования четырёх оптических изомеров. Витаминной активностью обладают изомеры, относящиеся к L-ряду.

Витамин С — бесцветное кристаллическое вещество с т. пл. 192 °С, хорошо растворимое в воде и спирте. В бескислородной среде устойчиво, может храниться годами. В присутствии кислорода и щелочей витамин С быстро разрушается. Аскорбиновая кислота широко распространена в природе, присутствует во всех тканях и органах животных и растений.

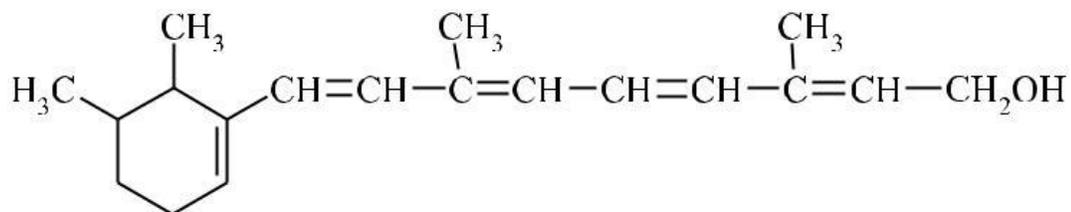
Витамин С является участником окислительно-восстановительных систем и обеспечивает нормальное протекание жизненно важных процессов в тканях.

При авитаминозе витамина С у человека развивается цинга, сопровождающаяся кровоизлияниями, разрушением зубов. В основе этих явлений лежат нарушения в синтезе коллагена. Аскорбиновая кислота играет роль кофактора в реакции гидроксилирования пролина, в результате которой образуется гидроксипролин — основной компонент коллагена.

Витамин С с гексациано-III-ферратом калия легко вступает в окислительно-восстановительную реакцию, который восстанавливается до гексациано-II-феррата калия, образующий с хлорным железом плохо растворимую в воде соль трёхвалентного железа — берлинскую лазурь темно-синего цвета.

Витамин С с раствором йода в йодиде калия обесцвечивается за счёт восстановления аскорбиновой кислоты йодом.

Витамин А – ретинол имеет несколько витамеров, из которых наиболее распространён витамин А, содержащий β-ионное кольцо и боковую цепь, состоящую из двух остатков изопрена и первичной спиртовой группы, в результате чего он получил название ретинола, или аскерофтола:



Ретинол — кристаллическое вещество лимонно-жёлтого цвета, хорошо растворим в жирах, бензине, эфире. Витамины группы А легко окисляются в присутствии кислорода. Окисляясь в организме при участии биокатализаторов, ретинол превращается в ретиналь, обладающий А-витаминной активностью.

Провитамином А является жёлтый пигмент растений — каротин. В организме каротин под влиянием каротиказы превращается в витамин А.

Витамин А входит в состав зрительного пурпура — родопсина, находящегося в палочках сетчатки. Под действием кванта света происходит распад родопсина на 11-цис-ретиаль и опсин. Для участия в акте зрения организм постоянно нуждается в цис-ретиале. Основная функция витамина А в организме человека — участие в акте зрения.

При отсутствии в пище витамина А в организме человека и животных развивается ряд специфических патологических изменений: ослабление зрения, поражение роговой оболочки, эпителиальных тканей, торможение роста, общее истощение организма.

Витамин А с трихлоруксусной сурьмой окрашивается в специфический синий цвет. Аналогичное синее окрашивание дают все соединения с сопряжёнными двойными связями.

Витамин А с концентрированной серной кислотой образует комплекс, окрашенный в синий цвет.

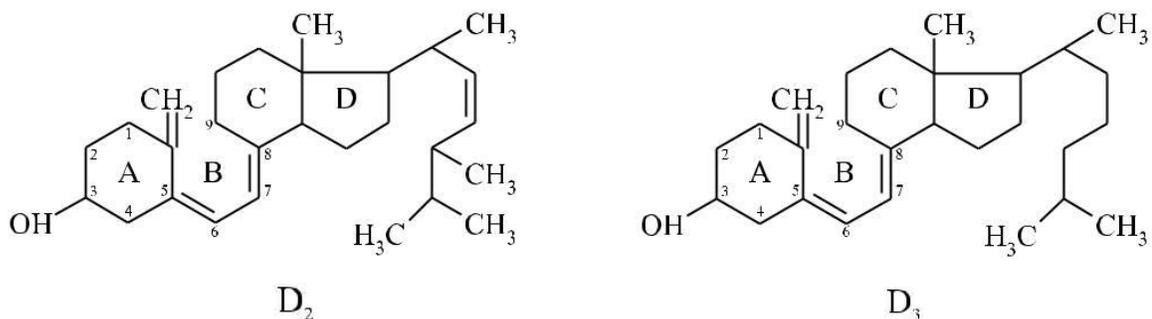
Витамин А с сульфатом железа (II) в кислой среде образует соединение, имеющее розово-красную окраску. Каротины дают при этой реакции зеленоватое окрашивание.

Витамин D относится к стероидам и является производным циклопентан-пергидрофенантрена. Как и витамин А, витамин D существует в виде нескольких витамеров. Наиболее распространены витамины D₂ (эргокальциферол) и D₃ (холекальциферол). Провитамином D₃ является 7-дегидрохолестерол, который под действием солнечной радиации переходит в витамин D₃.

Витамины D₂ и D₃ — бесцветные кристаллы с т. пл. 115–116°C, нерастворимые в воде и хорошо растворимые в жирах, хлороформе, бензоле.

Витамины D неустойчивы, легко разрушаются под действием окислителей и минеральных кислот.

При отсутствии в пище витамина D у детей развивается рахит. Причина его состоит в расстройстве фосфорно-кальциевого обмена и нарушении отложения фосфата кальция в костной ткани. Недостаток витамина D у взрослых проявляется в виде остеомаляции и остеопороза, возникающих вследствие вымывания из костей солей кальция и фосфора.



Витамин D с анилином в присутствии соляной кислоты образует соединения, окрашенные в красный цвет.

Витамин D с раствором брома в хлороформе окрашивается в зелено-голубой цвет.

Оснащение работы:

Биоматериал	Приборы и оборудование	Реактивы
Витамины B ₁ , B ₂ , B ₆ , C, A и D (или рыбьего жира).	Пробирки; штатив; скальпель; весы; нагревательный прибор.	Дистиллированная вода; тиаминхлорид; раствор гексациано-III-феррата калия (K ₃ [Fe(CN) ₆]); раствор гидроксида калия (30%); изобутиловый спирт; раствор сульфаниловой кислоты (1%); раствор нитрита натрия (5%); раствор карбоната натрия; конц. соляная кислота; металлический цинк; 1% раствор хлорида железа (III); 0,01% раствора йода в 0,2 % растворе йодида калия; хлороформный раствор (0,05%); раствор трихлоруксусной сурьмы (33%); бензол; конц. серная кислота; ледяная уксусная кислота; сульфат железа (II); анилиновый реактив (анилин с конц. соляной кислотой в соотношении 5:1); раствор брома в хлороформе (1:60).

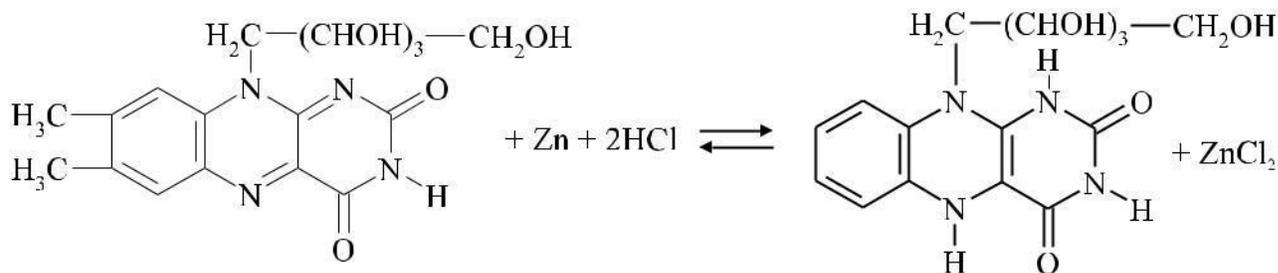
4. Затем по стенке пробирки осторожно добавляют 1 мл раствора Na_2CO_3 .

На границе двух жидкостей появляется кольцо оранжевого или красного цвета.

Работа №25. Реакция на витамин В₂

1. В пробирку приливают 1 мл 0,025% раствора рибофлавина.
2. Добавляют 0,5 мл концентрированной соляной кислоты.
3. Опускают кусочек металлического цинка.

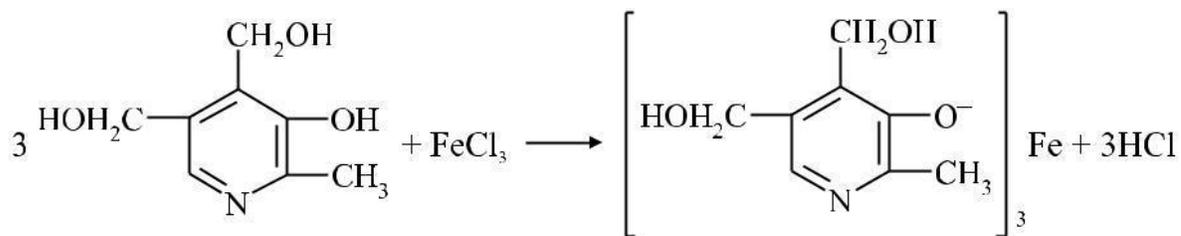
Выделяющийся водород реагирует с рибофлавином, восстанавливая его, и жидкость постепенно окрашивается в розовый цвет, а затем обесцвечивается. При взбалтывании обесцвеченного раствора лейкофлавин вновь окисляется кислородом воздуха в рибофлавин.



Работа №26. Реакция на витамин В₆ с хлоридом железа (III)

1. В пробирке вносят 1 мл 1% водного раствора пиридоксина.
2. Добавляют 2 капли 1% раствора FeCl_3 .
3. Смесь встряхивают.

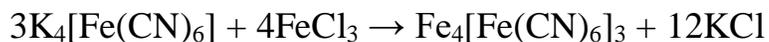
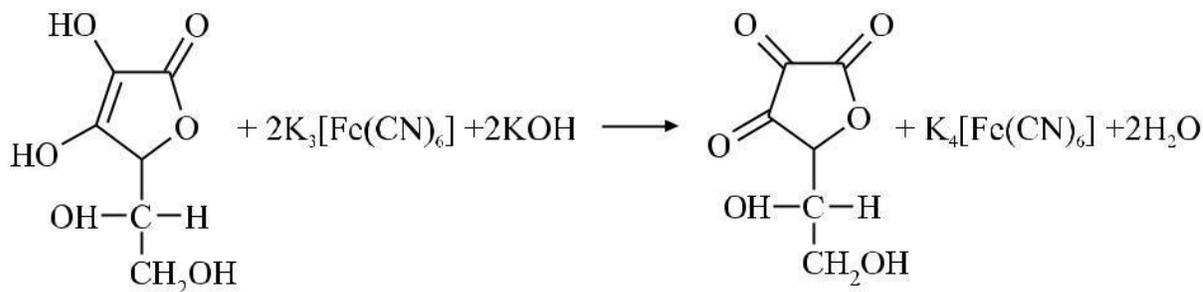
Наблюдают окрашивание жидкости в красный цвет.



Работа №27. Реакция витамина С с гексациано-III-ферратом калия

1. В пробирку вносят 1 мл 0,1% раствора аскорбиновой кислоты.
3. Прибавляют 1 мл 1% раствора гексациано-III-феррата калия.
4. Добавляют 0,5 мл 1% раствора FeCl_3 .

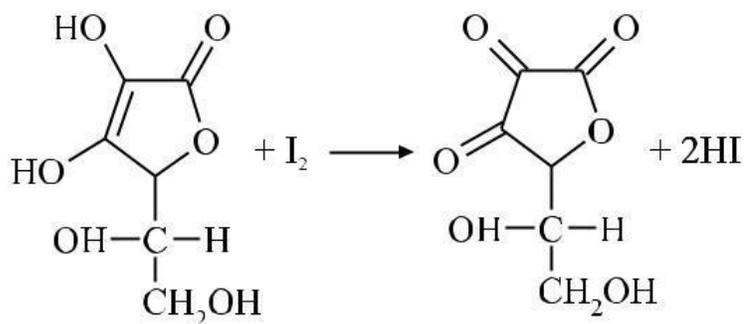
Наблюдают образование сине-зелёного окрашивания.



Работа №28. Реакция витамина С с йодом

1. В две пробирки наливают по 10 капель дистиллированной воды.
2. Прибавляют по 1–2 капли 0,01% раствора йода в 0,2% растворе йодида калия.
3. В №1 пробирку добавляют 10 капель аскорбиновой кислоты.
4. Во №2 пробирку — столько же воды.

В пробирке с аскорбиновой кислотой раствор йода обесцвечивается.



Работа №29. Реакция витамин А с трихлоруксусной сурьмой

1. В пробирку помещают 1–2 капли 0,05% хлороформного раствора ретинола (или рыбьего жира).
2. Добавляют 4–5 капель 33% раствора трихлоруксусной сурьмы (SbCl_3) в хлороформе и перемешивают.

Появляется синяя окраска.

Работа №30. Реакция витамин А с концентрированной серной кислотой

1. В пробирку вносят 1–2 капли раствора витамина А (в бензольном растворе).
2. Прибавляют 2–3 капли конц. H_2SO_4 .

Содержимое пробирки окрашивается в синий цвет, который через некоторое время переходит в фиолетовый цвет, а затем в бурый.

Работа №31. Реакция витамина А с сульфатом железа (II)

1. В пробирку вносят 2–3 капли раствора рыбьего жира в хлороформе (или масляного раствора витамина А).
2. Прибавляют 5–10 капель ледяной уксусной кислоты, насыщенной сульфатом железа (II).
3. Добавляют 1–2 капли конц. H_2SO_4 .

Появляется голубое окрашивание, постепенно переходящее в розово-красное.

Работа №32. Реакция витамина D с анилином

1. В пробирку помещают 1–2 капли рыбьего жира (или раствор витамина D в хлороформе).
2. Добавляют 1 каплю анилинового реактива.
3. Перемешивают и образуется эмульсия жёлтого цвета.
4. Содержимое пробирки осторожно нагревают при постоянном помешивании и кипятят 0,5 минуты.

Наблюдают красное окрашивание. Через 1–2 минуты эмульсия разделяется на два слоя, из которых нижний окрашен в интенсивный красный цвет.

Работа №33. Реакция витамина D с бромом

1. В пробирку помещают 2–4 капли рыбьего жира.
 2. Добавляют 4–5 капель раствора брома в хлороформе (1:60).
- Смесь в пробирке постепенно окрашивается в зелено-голубой цвет.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНОВ

Современные методы количественного определения витаминов в биологических объектах делят на физико-химические и биологические.

При взаимодействии витаминов с рядом химических соединений наблюдаются характерные цветные реакции, интенсивность окраски которых пропорциональна концентрации витаминов в исследуемом растворе. Поэтому витамины можно определять *фотокolorиметрически*. Эти методы позволяют судить как о наличии витамина, так и о количественном содержании их в

исследуемом пищевом продукте или органах и тканях человека и животных. Для выяснения обеспеченности организма человека каким-либо витамином часто определяют соответствующий витамин в сыворотке крови, моче. Однако фотокolorиметрические методы могут быть применимы не во всех случаях. Например, витамин А имеет специфическую полосу поглощения при 328–330 нм. Для определения витаминов А, В₁, В₂ и других применяют *флюорометрические* методы. Широко используют и *титрометрические* методы. Например, витамин С определяют, титруя его раствор в кислой среде 2,6-дихлорфенолиндофенолом.

Биологические методы основаны на определении того минимального количества витамина, которое при добавлении к искусственной диете, лишённой только данного изучаемого витамина, предохраняет животное от развития авитаминоза или излечивает его от уже развывшейся болезни. Количество витаминов принято выражать в миллиграммах, микрограммах.

Определение витамина С в растительном материале основан на способности витамина С восстанавливать 2,6-дихлор-фенолиндофенол, который в кислой среде имеет красную окраску, а при восстановлении обесцвечивается, в щелочной среде окраска синяя. Для предохранения витамина С от разрушения исследуемый раствор титруют в кислой среде щелочным раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолом до появления розового окрашивания.

Определение содержания витамина С в моче даёт представление о запасах этого витамина в организме, так как наблюдается соответствие между концентрацией витамина С в крови и количеством этого витамина, выделяемого с мочой. Однако при гиповитаминозе С содержание аскорбиновой кислоты в моче не всегда понижено. Часто оно бывает

нормальным, несмотря на большой недостаток этого витамина в тканях и органах.

У здоровых людей введение 100 мг витамина С быстро приводит к повышению его концентрации в крови и моче. При гиповитаминозе С ткани, испытывающие недостаток в витамине, задерживают принятый витамин С, и его концентрация в моче не повышается. Моча здорового человека содержит 20–30 мг витамина С или 113,55–170,33 мкмоль/сут. У детей уровень этого витамина понижается при цинге, а также острых и хронических инфекционных заболеваниях.

Определение витамина Р (рутина) в чае — чёрном и зелёном показывает на способность окисляться перманганатом калия, в качестве индикатора применяется индигокармин, который вступает в реакцию с перманганатом калия, после того как окислится весь рутин. Экспериментально установлено, что 1 мл 0,1 н. раствора перманганата калия окисляет 6,4 мкг рутина.

Определение витамина В1 в моче основано на окислении тиамин в тиохром, экстракции тиохрома органическим растворителем и изменении интенсивности голубой флюоресценции. Для количественного определения тиамин сравнивают флюоресценцию окисленных стандартных и испытуемых растворов тиаминхлорида на флюорометре.

Оснащение работы:

Биоматериал	Приборы и оборудование	Реактивы
Витамин С (или ягоды шиповник, хвоя, капуста, морковь, картофель); моча; чай (чёрный и зелёный); индигокармин.	Пробирки; штатив; весы; фарфоровые ступки с пестиками; мерные цилиндры (10, 25 мл); мерные колбы (25 мл); конические колбы (50–100 мл); воронки стеклянные; пипетки (1, 2, 5, 10 мл); микробюретки (4, 5 мл); кварцевый песок; бумажные фильтры; флюорометр.	Дистиллированная вода; соляная кислота (10%); натриевая соль 2,6-дихлорфенолиндофенола (0,001 н.); раствор перманганата калия (0,05 н.); раствор гидроксида натрия (20%), рабочий стандартный раствор тиамин (10 мкг в 1 мл), этанол, изобутанол.

Пошаговое проведение работы:

Работа 34. Определение витамина С в растительном материале.

1. Готовят исследуемый растительный материал. Взвешивают: 1 г ягод шиповника, или 1 г сосновой хвои, или 1 г капусты, или 5 г картофеля, или 5 г капусты.

2. Мелко измельчают, помещают в ступку и растирают с небольшим количеством кварцевого песка.

3. Добавляют 2 мл 10% HCl и 8 мл дистиллированной воды.

4. Затем без потерь содержимое ступки переносят в мерную колбу на 25 мл.

5. Доводят водой до метки.

6. Полученную смесь оставляют на 5–10 минут, постоянно перемешивая.

7. Затем содержимое колбы фильтруют через бумажный складчатый фильтр. Экстракт, полученный из картофеля, не фильтруют.

8. Проводят титрование. Отмеряют 2 мл фильтрата.

9. Добавляют 10 капель 10% раствора HCl.

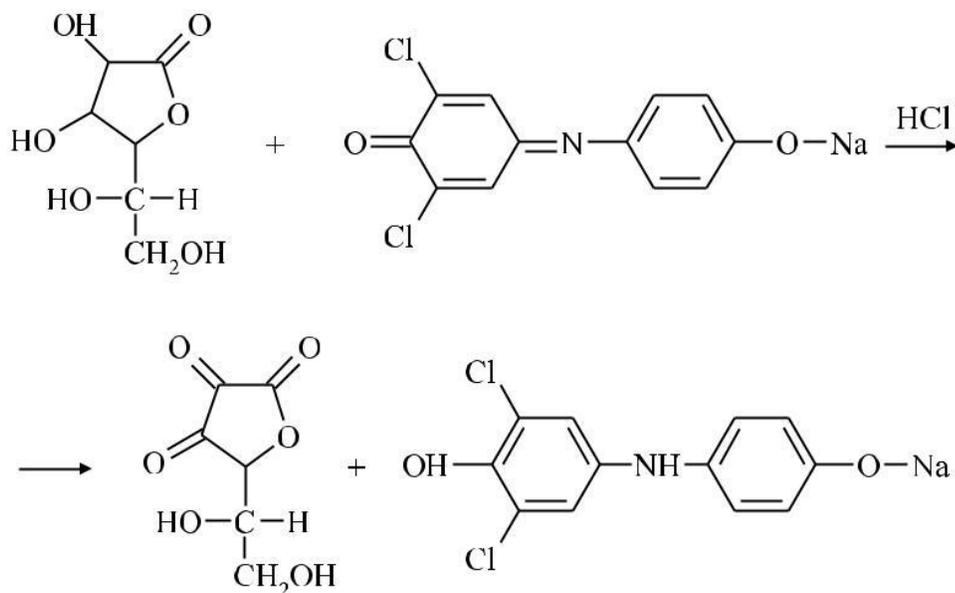
10. Затем титруют 0,001 н. раствором натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола до розовой окраски, сохраняющейся в течение полминуты.

11. Расчёт содержимое аскорбиновой кислоты в 100 г исследуемого растительного материала проводят по формуле:

$$X = 0,088 \cdot A \cdot \Gamma \cdot 100 / B \cdot B,$$

где X — содержание витамина С в мг на 100 г продукта, 0,088 — содержание аскорбиновой кислоты (мг), А — результат титрования 0,001 н. раствором натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенолом (мл), Б — объем

экстракта, взятый для титрования (мл), В — количество продукта, взятого для анализа (г), Г — общее количество экстракта (мл), 100 — пересчёт на 100 г продукта.



Работа 35. Определение содержания витамина С в моче

1. Чистый, сухой стаканчик или колбочка.
2. Отмеривают 10 мл мочи и 10 мл дистиллированной воды.
3. Перемешивают, подкисляют 20 каплями 10% раствора соляной кислоты.
4. Титруют 0,001 н. раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до розовой окраски.
5. Расчёт содержания аскорбиновой кислоты в моче проводят по формуле:

$$X = 0,088 \cdot A \cdot B/\Gamma,$$

где X — содержание аскорбиновой кислоты (мг/сут); А — результат титрования 0,001 н. раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола (мл); Б — объем мочи, взятый на титрование (мл); В — среднее суточное количество мочи (для мужчин — 1 500 мл, для женщин — 1 200 мл).

Работа 36. Определение витамина Р в чае — чёрном и зелёном

1. Чистый, сухой стаканчик или колбочка.
2. К 100 мг чая чёрного и отдельно зелёного приливают 50 мл горячей дистиллированной воды.
3. Проводят экстракцию в течение 5 минут.
4. 10 мл экстракта чёрного и зелёного чая помещают в конические колбы.
5. Добавляют по 10 мл дистиллированной воды.
6. Прибавляют 5 капель индигокармина, содержимое колб окрашивается в синий цвет.
7. Титруют из микробюретки 0,05 н. раствором перманганата калия до появления устойчивой жёлтой окраски.
8. Определяют процентное содержание витамина Р в чае по формуле:

$$X = 3,2 \cdot A \cdot V_1 \cdot 100 / V_2 \cdot P \cdot 1000,$$

где X — содержание витамина Р в чае (%), 3,2 — стандартный пересчётный коэффициент; А — результат титрования 0,05 н. раствором перманганата калия (мл); V_1 — объем, в котором растворена взятая для анализа навеска (мл); 100 — общее количество вещества для расчёта процентного содержания(г); V_2 — объем раствора, взятый для титрования (мл); Р — навеска (мг); 1000 — перевод микрограммов в миллиграммы. Сравнивают содержание витамина Р в чёрном и зелёном чае.

Работа 37. Количественное определение витамина В₁ в моче

1. Чистые, сухие делительные воронки, нумеруют (№1, 2, 3, 4).
2. В делительную воронку наливают 6–8 мл мочи.

3. Прибавляют равный объем изобутанола и встряхивают в течение 2 минут.
4. Промытую мочу (нижний слой) сливают в две (№1 и 2) сухие делительные воронки (по 2 мл) и прибавляют по 1 мл раствора NaOH.
5. В опытную воронку №1 по каплям вносят свежеприготовленный раствор гексациано-(III)-феррата калия до тех пор, пока окраска не сохранится в течение полминуты.
6. В опытную №1 и контрольную №2 воронки прибавляют по 5 мл дистиллированной воды.
7. Добавляют по 10 мл изобутанола и интенсивно встряхивают в течение 2 мин.
8. Нижний слой мочи сливают, а верхний (изобутанол) собирают в две сухие пронумерованные пробирки.
9. В №3 делительную воронку вносят 1 мл рабочего стандартного раствора тиаминина и 1 мл воды.
10. В №4 — 2 мл дистиллированной воды.
11. В обе воронки прибавляют по 1 мл раствора NaOH, по 10 капель раствора гексациано-(III)-феррата калия и встряхивают.
12. Доливают по 5 мл воды и по 10 мл изобутанола.
13. Снова встряхивают в течение 2 минут.
14. Нижний слой удаляют, а верхний собирают в две сухие пронумерованные пробирки.
15. Для просветления растворов во все четыре пробирки — опытную, стандартную и две контрольные — добавляют по 2 мл этанола.
16. Проводят сравнение интенсивности флюоресценции исследуемой мочи и контроля.

17. Содержание тиамин определяют на флюорометре по флюоресценции тиохрома.

18. Массовую концентрацию тиамин (мкг) в исследуемом материале находят по формуле:

$$X = C(E_{\text{оп}} - E_{\text{к}}) V_0 / E_{\text{ст}} V_1,$$

где X — массовая концентрация тиамин в моче, C — концентрация тиамин в 1 мл рабочего стандартного раствора (10 мкг); V_1 — объем мочи, взятой для анализа (2 мл); V_0 — общий объем мочи за сутки (мл); $E_{\text{оп}}$ — интенсивность флюоресценции опытной пробы; $E_{\text{к}}$ — контрольной; $E_{\text{ст}}$ — стандартной.

Вывод. Указать особенности проведенных реакций и объяснить, почему витамин способны вступать в различные качественные и количественные реакции.

Вопросы и задания для самоконтроля:

1. Какова биологическая роль витамин?
2. На чем основана классификация витамин?
3. На каких принципах основана номенклатура витамин? Приведите примеры. В каком году принята Международная номенклатура витамин?
4. Какая связь существует между витамин и ферментами?
5. Что такое гипо-, гипер-, авитаминозы?
6. Почему недостаток в пище водорастворимых витамин быстрее приводит к развитию гиповитаминоза, чем недостаток жирорастворимых?
7. Какова химическая природа пиридоксина? Напишите структурные формулы всех витамин B_6 .

8. Какой витамин входит в состав кофермента, участвующего в реакциях трансаминирования? Выразите схемой механизм реакции переаминирования аспартата и пирувата с участием кофермента трансаминаз.

9. Какова химическая природа аскорбиновой кислоты?

10. Для какого витамина характерна реакция с 2,6-дихлофенолиндифенолом? Приведите уравнение реакции.

11. Производное какого витамина участвует в реакции декарбоксилирования кетокислот? Приведите схему уравнения реакции декарбоксилирования пирувата с участием тиаминпирофосфата.

12. Напишите уравнение реакции окисления витамина В1 в тioxром гексациано-III-ферратом калия в щелочной среде.

13. Какие коферменты входят в состав витамина В₂? Напишите структурные формулы. Приведите схему дегидрогеназной реакции с участием этих коферментов.

14. Напишите уравнение реакции окисления β-токоферола до β-токохинона.

15. С помощью какой реакции можно открыть рибофлавин? Приведите уравнение этой реакции.

16. Какие принципы лежат в основе количественного определения витаминов в биологических материалах?

3.5 ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Нуклеиновые кислоты играют основную роль в сохранении и реализации генетической информации. В каждом живом организме присутствуют два типа нуклеиновых кислот: *рибонуклеиновая кислота* (РНК) и *дезоксирибонуклеиновая кислота* (ДНК). В то же время вирусы содержат только один какой-нибудь тип нуклеиновых кислот: либо РНК, либо ДНК. Нуклеиновые кислоты определяют *вид, форму, состав* и т. д. живой клетки и её *функции*. Роль нуклеиновых кислот в организме трудно переоценить. Все нуклеиновые кислоты представляют собой высокомолекулярные соединения, хотя размер их сильно варьирует: от 25 000 до 1 000 000 000.

Цель раздела: ознакомиться с качественными реакциями на определения состава нуклеиновых кислот.

Выделение рибонуклеопротеинов (РНП) из дрожжей и качественное определение продуктов их гидролиза. Нуклеиновые кислоты являются составной частью сложных белков (нуклеопротеинов), содержащихся во всех клетках животных, растений, бактерий, вирусов. Нуклеиновые кислоты — сильнокислые и при физиологических значениях рН несут отрицательный заряд. Этим объясняется способность нуклеиновых кислот взаимодействовать по типу ионной связи с основными белками (гистонами и негистонами), ионами металлов (преимущественно с Mg^{2+}), а также полиаминами (спермином, спермидином). Поэтому для выделения нуклеиновых кислот из комплекса с белками необходимо, прежде всего разрушить эти сильные и многочисленные электростатические связи между положительно заряженными молекулами белков и отрицательно заряженными молекулами нуклеиновых кислот.

Для этого измельчённый путём гомогенизации биоматериал обрабатывают крепкими солевыми растворами (10 % раствор хлорида натрия) и затем этанолом. В настоящее время для выделения нуклеиновых кислот в нативном состоянии пользуются более мягким фенольным методом, основанном на обработке нейтрального забуференного раствора нуклеопротеидов фенолом. Обычно эту процедуру проводят в присутствии веществ, вызывающих денатурацию белкового компонента (например, до децилсульфата или салицилата натрия), затем смесь подвергают центрифугированию. При этом денатурированный белок попадает в фенольную фракцию, а нуклеиновые кислоты остаются в водной, из которой их осаждают на холоде добавлением 2–3 объёмов этанола. Этим методом удаётся получить достаточно очищенные препараты нуклеиновых кислот.

В настоящее время применяют ряд усовершенствованных методов разделения нуклеиновых кислот на фракции из суммарного препарата, полученного описанным выше методом. В их числе хроматография на геле фосфата кальция, ионнообменная хроматография на адсорбентах ДЭАЭ-целлюлозе, ДЭАЭ-сефадексе и других, ультрацентрифугирование в градиенте плотности сахарозы, фильтрация через гели агарозы и сефарозы, гельэлектрофорез и др.

После получения нуклеиновых кислот в чистом виде их подвергают гидролизу для изучения химического состава.

Оснащение работы:

Биоматериал	Приборы и оборудование	Реактивы
Пекарские дрожжи	Центрифуга; колбы круглодонные (100 мл) с обратным воздушным холодильником; ступки с пестиком; кварцевый песок; стаканы с носиком (200 мл); цилиндры мерные (50 мл); воронки стеклянные; палочки	Дистиллированная вода; гидроксид натрия (0,4% и 10%); уксусная кислота (10%); соляная кислота (конц.); сульфат меди (1%); аммиак (конц.); нитрат серебра (1%); диэтиловый эфир, серная кислота (10%); орциновый реактив ¹ ; раствор флороглюцина ² ;

	стеклянные; пробирки; песчаные бани; фильтровальная бумага; лакмусовая бумага.	Фелингова жидкость ³ ; молибдат аммония ⁴ ; магниезальная смесь ⁵ .
--	--	--

¹ Орциновый реактив: 50 мл $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ растворяют в 250 мл концентрированной соляной кислоты ($\rho=1,14$ г/мл). Этот раствор хранят в склянке тёмного цвета под тягой не более одного месяца. Перед опытом к нему добавляют орцин, из расчёта на 1 мл раствора 4,76 мг орцина.

² Раствор флороглюцина: 0,2 г флороглюцина растворяют в 100 мл 30% соляной кислоты.

³ Фелингова жидкость: готовят два раствора: А. — 34,6 г $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ в 500 мл раствора. Б. — 17,3 г сегнетовой соли и 70 г $NaOH$ в 500 мл раствора. Растворы хранят отдельно. Перед применением смешивают равные объёмы первого и второго раствора.

⁴ Молибдат аммония: смешивают 15% раствор молибдата аммония с конц. азотной кислотой в отношении 110:90.

⁵ Магниезальная смесь: 100 г хлорида магния, 200 г хлорида аммония, 20 мл конц. раствора аммиака растворяют в воде и доводят до 1 литра.

КАЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Пошаговое проведение работы:

Работа 38. Подготовка гидролизата.

1. **Гомогенизация.** 10 г дрожжей смешивают в ступке со смесью из 2 мл эфира и 2 мл воды, добавляют 5 г песка и тщательно растирают, приливая к растёртой массе небольшими порциями 40–50 мл 0,4% раствора гидроксида натрия. Растирание продолжают в течение 15–20 минут.

2. **Центрифугирование.** После этого гомогенат помещают в центрифужные пробирки для центрифугирования. Центрифугат сливают в стакан и к нему прибавляют небольшими порциями (по 0,5 мл) 10% уксусную кислоту до слабокислой реакции по лакмусу (5–6 мл). Полученный осадок нуклеопротеидов отделяют центрифугированием.

3. **Гидролиз.** Осадок из центрифужной пробирки помещают в колбу для гидролиза, приливают 20 мл 10% раствора серной кислоты. Колбу закрывают пробкой с проходящим через неё воздушным холодильником (стеклянная

трубка длиной 70 см и диаметром 0,7–0,8 см), смесь кипятят на песчаной бане в течение 1 часа, поддерживая слабое кипение.

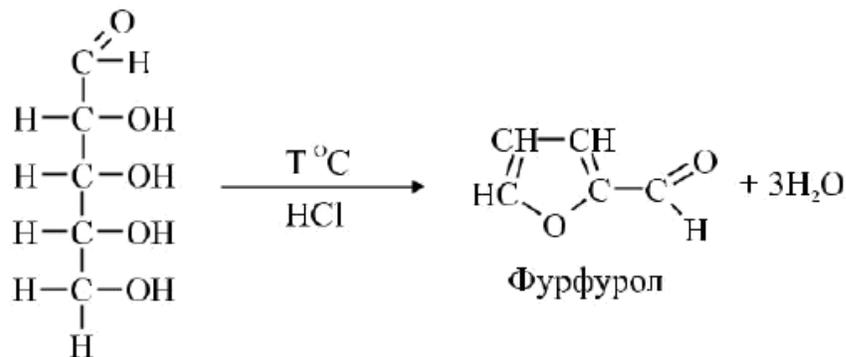
4. **Анализ гидролизата.** Гидролизат отфильтровывают и в прозрачном фильтрате определяют белки, пентозы, пуриновые основания, фосфорную кислоту.

Работа 39. Определение белков.

Белки обнаруживают с помощью биуретовой реакции (см. работу 1).

Работа 40. Определение рибозы по реакции с орцином или флороглюцином.

1. В пробирку вносят готовый гидролизат.
2. Гидролизат нагревают с 20% соляной кислотой, рибоза дегидратируется и превращается в фурфурол:



3. Фурфурол конденсируется с орцином или флороглюцином с образованием соединений зелёного (с орцином) и розово-красного (с флороглюцином) цвета. Дезоксирибоза не даёт этой реакции.

4. К 1 мл реактива орцина (или флороглюцина) добавляют половинный объем гидролизата, 1 мл конц. HCl и нагревают до кипения.

Наблюдают появление соответствующего окрашивания.

Работа 41. Определение пентозы с помощью реактива Фелинга.

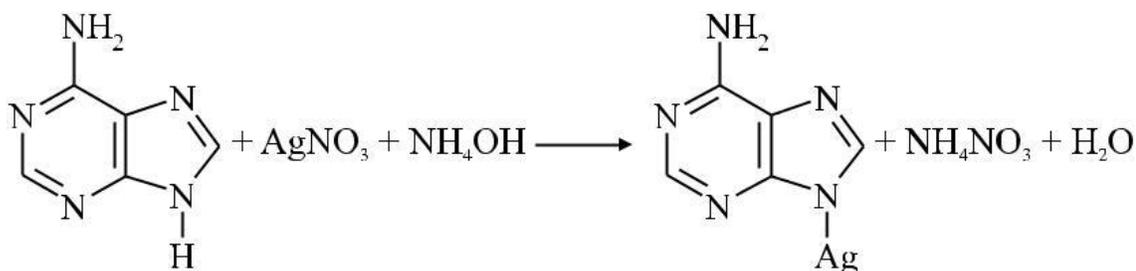
1. В пробирку вносят 0,5 мл гидролизата.
2. В гидролизат добавляют 1 мл 10% раствора щелочи.
3. Добавляют 0,5 мл реактива Фелинга, перемешивают, нагревают до кипения.

Наблюдают появление осадка красного цвета.

Работа 42. Определение пуринового основания по реакции с аммиачным раствором нитрата серебра.

1. В пробирку вносят 2 мл гидролизата.
2. Приливают по каплям концентрированный раствор аммиака до щелочной реакции по лакмусу (приблизительно 10 капель).
3. Затем добавляют равный объем 2% аммиачного раствора нитрата серебра.

Через 3–5 минут образуется светло-коричневый осадок серебряных солей пуриновых оснований, содержимое пробирки перемешивать не следует.



Аммиачный раствор нитрата серебра

Работа 43. Определение фосфорной кислоты с помощью молибдата аммония или магниальной смеси.

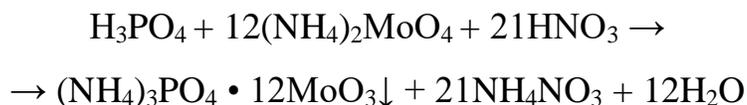
1. В пробирку вносят 2 мл раствора молибдата аммония в азотной кислоте.

2. Прибавляют 1 мл гидролизата.

3. Смесь слегка нагревают.

Образуется жёлто-зелёный осадок фосфомолибдата аммония.

Молибденовая проба на фосфорную кислоту:



Вывод. Указать особенности проведённых реакций и объяснить, почему нуклеиновые кислоты способны вступать в различные качественные реакции.

Вопросы и задания для самоконтроля:

1. Какие вещества являются мономерами нуклеиновых кислот? При помощи каких химических связей они соединены в полинуклеотидные цепи?

2. Чем отличаются нуклеозиды от нуклеотидов? Напишите структурные формулы нижеперечисленных соединений, укажите, какие из них относятся к нуклеозидам, к нуклеотидам: дезоксицитидин, 5'-фосфатаденозин, тимидин, 3'-фосфатуридин.

3. Какие постоянные и минорные азотистые основания встречаются в ДНК?

4. В чём состоит принцип комплементарности в строении нуклеиновых кислот? В чём суть правил Чаргаффа?

5. Какие взаимодействия обеспечивают удержание взаимозакрученных дезоксирибонуклеотидных цепей в составе биспиральной молекулы ДНК?

6. Какие волокнисто-кристаллические структуры ДНК выявлены в настоящее время?

7. Каковы основные параметры (шаг, число пар нуклеотидных остатков на виток, расстояние между нуклеотидными остатками по высоте, диаметр) двойной спирали ДНК, находящейся в β -форме?

8. Каковы различия в химическом составе молекул ДНК и РНК?

9. Каковы функции ДНК и РНК в клетке?

10. Какова классификация РНК?

11. β -форма кристаллической ДНК устойчива в условиях 97 % относительной влажности. Если влажность изменить до 76 %, то происходит переход β -формы в α -форму. Вычислите, на какую величину (мкм) изменится длина фрагмента ДНК, молекулярная масса которого равна 1 млн. Да, если из β -формы он перейдёт в α -форму.

3.6 ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ И ПРИНЦИП МЕТОДА ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты в биологическом материале (пробе).

Открытию полимеразной цепной реакции предшествовало развитие молекулярно-биологических технологий.

В 1944 г. О. Эвери, К. Маклеод и М. Маккарти провели ряд экспериментов по трансформации бактерий и доказали, что за трансформацию (приобретение болезнетворных свойств безвредной культурой в результате добавления в неё мёртвых болезнетворных бактерий) отвечают выделенные из пневмококков ДНК. В 1955 г. А. Корнберг открыл фермент – ДНК-полимеразу, которая способна удлинять цепь ДНК, присоединяя нуклеотиды к её 3'-концу. В искусственных условиях фермент катализирует реакцию достраивания участка искомой ДНК от затравки (праймера), которая комплементарно связана с цепью ДНК (матрицей). Раствор, в котором происходит эта реакция, должен содержать нуклеозидтрифосфаты, используемые в качестве строительных блоков. В 1971 г. Х. Клеппе и соавторы рассмотрели данные, касающиеся состава ингредиентов реакционной смеси, и принципы использования коротких искусственно синтезированных молекул ДНК-праймеров для получения новых копий ДНК.

Однако возможность использования ПЦР в плане наработки большого количества копий нуклеиновых кислот ещё не рассматривалась. Это было связано с техническими трудностями, обусловленными необходимостью

трудоёмкого синтеза праймеров, и нестабильностью фермента. В начале использования метода ПЦР после каждого цикла нагревания и охлаждения ДНК-полимеразу приходилось добавлять в реакционную смесь, так как она быстро инактивировалась при высокой температуре, необходимой для разделения цепей спирали ДНК. Процедура была очень неэффективной, требовала много времени и фермента.

В 1975 г. Т. Брок и Х. Фриз открыли *Thermus aquaticus* – граммотрицательную палочковидную экстремально термофильную бактерию, а в 1976 г. из неё была впервые выделена Taq-полимераза. Преимуществом данного фермента была способность стабильно работать при повышенных температурах (оптимум 72-80°C). В 1983-1984 гг. К. Мюллис провёл ряд экспериментов по разработке ПЦР и первым начал использовать Taq-полимеразу вместо неустойчивой к высоким температурам ДНК-полимеразы. Это позволило ускорить работы по разработке полимеразной цепной реакции. Кроме того, К. Мюллис вместе с Ф. Фалуном разработали алгоритм циклических изменений температуры в ходе ПЦР. Таким образом, сформировался принцип использования ПЦР как метода амплификации *in vitro* заданных фрагментов ДНК с полностью или частично известной последовательностью.

Результатом открытия ПЦР стало почти немедленное практическое применение метода. В 1985 г. Саики с соавторами опубликовали статью, в которой была описана амплификация геномной последовательности β -глобина. С этого момента количество публикаций о применении ПЦР в своей работе стало увеличиваться в геометрической прогрессии. В настоящее время предложены различные модификации ПЦР, показана возможность создания тест-систем для обнаружения микроорганизмов, выявления точечных мутаций, описаны десятки различных применений метода.

Таким образом, открытие метода ПЦР стало одним из наиболее выдающихся событий в области молекулярной биологии за последние десятилетия. Это позволило поднять медицинскую диагностику на качественно новый уровень.

ПРАВИЛА

проведения работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции (основные положения)

1. Область применения

Данные правила предназначены для учреждений здравоохранения и санэпиднадзора, использующих метод полимеразной цепной реакции в целях диагностики инфекционных заболеваний.

2. Обоснование необходимости

Благодаря высокой специфичности и чувствительности метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) находит широкое применение в диагностике возбудителей инфекционных заболеваний. Однако ПЦР-диагностика инфекций связана с проблемой, обусловленной высокой чувствительностью метода, - возможностью контаминации.

Попадание в реакционную пробирку следовых количеств положительной ДНК (специфических продуктов амплификации ДНК - ампликонов; ДНК-стандарта, используемой в качестве положительного контроля; положительной ДНК клинического образца) приводит к амплификации в процессе ПЦР специфического фрагмента ДНК и, как следствие, к появлению ложноположительных результатов.

Сотрудник, занимающийся ПЦР-диагностикой, в своей работе сталкивается с двумя видами контаминации:

1. Перекрёстная контаминация от пробы к пробе (в процессе обработки клинических образцов или при раскапывании реакционной смеси), приводящая к появлению спорадических ложноположительных результатов;

2. Контаминация продуктами амплификации (ампликонами), имеющая наибольшее значение, поскольку в процессе ПЦР ампликоны накапливаются в огромных количествах и являются идеальными продуктами для реамплификации.

Контаминация следовыми количествами ампликонов посуды, автоматических пипеток и лабораторного оборудования, поверхностей лабораторных столов или даже поверхности кожи сотрудников лаборатории приводит к появлению систематических ложноположительных результатов.

Определить источник контаминации бывает очень трудно и требует значительных затрат времени и средств. Накопленный к настоящему времени опыт работы лабораторий, использующих полимеразную цепную реакцию для диагностики инфекций (ПЦР-диагностические лаборатории) позволяет сформулировать основные требования к планировке таких подразделений и проведению самих анализов. Соблюдение данных требований обеспечивает исключение возможности контаминации и получения ложноположительных результатов.

3. Планировка помещений и основные принципы организации работы ПЦР-диагностических лабораторий

1) Лаборатория должна быть разделена на зоны (комнаты) для каждой из стадий ПЦР-диагностики. Следует иметь не менее двух комнат:

- пре-ПЦР-помещение, где проводится обработка клинических образцов, выделение ДНК, приготовление реакционной смеси для ПЦР и постановка ПЦР (при наличии условий два последних этапа рекомендуется также проводить в дополнительном отдельном помещении) – в этих

помещениях запрещается проводить все другие виды работ с инфекционными агентами (микробиологический анализ, ИФА, другие диагностические тесты и т.д.).

- пост-ПЦР-помещение, где проводится детекция продуктов амплификации – в пост-ПЦР-помещении допускается использовать другие методы детекции инфекций, диагностика которых проводится в данной лаборатории.

2) Комнату детекции продуктов амплификации (пост-ПЦР-помещение) следует расположить как можно дальше от пре-ПЦР-помещений.

3) Следует исключить движение воздушного потока из пост-ПЦР в пре-ПЦР-помещения.

4) В комнате приготовления реакционной смеси и в комнате обработки клинических образцов должны быть установлены настольные боксы с ультрафиолетовыми лампами.

5) Работа в лаборатории должна быть организована в одном направлении: от пре-ПЦР-помещений к пост-ПЦР-помещению.

6) Каждое помещение ПЦР-диагностической лаборатории должно иметь свой набор реагентов, автоматических пипеток, наконечников, пластиковой и стеклянной посуды, лабораторного оборудования, халатов и перчаток, используемых только в данном помещении и не выносящихся в другие ПЦР-помещения. Оборудование, материалы и инвентарь в каждой комнате должны иметь соответствующую маркировку.

7) Обработка рабочей одежды из пре- и пост-ПЦР-помещений должна производиться отдельно.

8) Следует однократно использовать перчатки, как в комнате обработки клинических образцов, так и в комнате приготовления реакционной смеси и постановки ПЦР.

9) Необходимо однократно использовать пробирки и наконечники для автоматических пипеток. Обязательно менять наконечники при переходе от одной пробы к другой с целью предотвращения перекрёстной контаминации в процессе выделения ДНК или при раскапывании реакционной смеси.

10) Необходимо использовать наконечники для автоматических пипеток с аэрозольным барьером (или наконечники с ватными фильтрами, приготовленными в помещении, в котором не ведутся работы с ДНК) при обработке клинических образцов, а также при внесении выделенной ДНК в реакционную пробирку.

11) Каждый сотрудник лаборатории должен иметь персональный набор автоматических пипеток и реагентов.

12) В пре-ПЦР и пост-ПЦР-помещениях лаборатории должны работать разные сотрудники.

13) Клинические образцы должны храниться отдельно от реагентов.

14) Не следует использовать водяные бани, т.к. заполняющая их вода, просачиваясь в недостаточно плотно закрытые пробирки, может стать источником контаминации; следует использовать суховоздушные термостаты.

15) При исследовании материала заражённого или подозрительного на заражённость возбудителями инфекционных заболеваний I-IV групп работа должна проводиться с соблюдением «Санитарных правил (безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности)» и «Положения о порядке учёта, хранения, обращения, отпуска и пересылки культур бактерий, вирусов, риккетсий, грибов, простейших, микоплазм, бактериальных токсинов, ядов биологического происхождения».

16) Необходимо постоянно поддерживать чистоту на рабочем месте:

- каждое помещение должно иметь свой отдельный набор инвентаря для обработки и уборки рабочего места (ватно-марлевые тампоны, пинцет, 70-и % этанол, дезинфицирующий раствор и т.д.), и источники ультрафиолетового излучения, которые эффективно инактивируют ДНК-матрицы.

- при манипуляциях с клиническим материалом рабочую поверхность до и после исследования обрабатывают дезинфицирующим раствором (указанным для данного возбудителя) и затем 70-и % этанолом.

- следует обрабатывать рабочую поверхность в комнате приготовления реакционной смеси до работы 70-и % этанолом с целью борьбы с пылью.

17) Следует полностью исключить проведение в ПЦР-диагностической лаборатории работ, связанных с получением (клонированием) и выделением рекомбинантных плазмид, содержащих последовательности ДНК или фрагментов генов возбудителей, которые диагностируются в данной лаборатории.

18) Персонал, работающий в ПЦР-диагностической лаборатории должен пройти соответствующее обучение.

4. Требования к проведению ПЦР-анализа

Обработка клинических образцов

1) Забор клинических образцов необходимо производить только в одноразовые пластиковые пробирки или в стеклянные пробирки, предварительно обработанные в течение 1 часа хромовой смесью, тщательно промытые дистиллированной водой и прокалённые.

2) Работать только в одноразовых перчатках.

3) Необходимо использовать одноразовые наконечники для автоматических пипеток с аэрозольным барьером.

4) Обязательно менять наконечники при переходе от одной пробы к другой.

5) Использованные пробирки и наконечники должны сбрасываться в одноразовые контейнеры или в специальную ёмкость с 1N раствором соляной кислоты.

Постановка ПЦР

1) Работать только в одноразовых перчатках.

2) Следует готовить смесь реактивов для ПЦР, рассчитанную на все пробы, включая контрольные, и затем - раскапывать её по пробиркам.

3) Использовать автоматические пипетки с переменным объёмом и одноразовые наконечники.

4) В каждый момент работать только с одной пробиркой.

5) Во всех случаях постановки ПЦР следует обязательно применять отрицательные и положительные контроли в соответствии с инструкцией по применению диагностических наборов.

6) Подготовленные к ПЦР исследуемые образцы должны добавляться в реакционные смеси одноразовыми наконечниками с аэрозольным барьером в последнюю очередь. Использованные наконечники следует сбрасывать в ёмкость с 1N раствором HCl.

Детекция продуктов амплификации.

1) Анализ продуктов ПЦР должен производиться в изолированной комнате сотрудником лаборатории, не производящим обработки клинических образцов и операций с реакционной смесью.

2) Работать следует только в одноразовых перчатках.

3) Оборудование, реактивы, халаты, перчатки, а также уборочный инвентарь, используемые в комнате детекции продуктов амплификации

(пост-ПЦР-помещение), должны храниться только в этой комнате и не должны попадать в пре-ПЦР-помещения.

4) В комнате детекции продуктов амплификации необходимо работать в сменной обуви.

5. Использование физических и химических методов борьбы с контаминацией

1) Рабочие поверхности, оборудование и материалы следует облучать ультрафиолетом с максимумом излучения в области 260 нм. Облучение необходимо проводить в течение 1 часа до начала работы и в течение 1 часа после окончания работы.

2) Использованные наконечники для автоматических пипеток, пробирки и другие загрязнённые ДНК материалы необходимо обрабатывать реагентами, вызывающими деградацию ДНК (1N HCl, 10% гипохлоритом натрия или 10% хлорной известью).

6. Оценка качества работы ПЦР-диагностической лаборатории

1) Для оценки качества работы ПЦР-диагностической лаборатории следует периодически применять зашифрованные внутрилабораторные контрольные положительные и отрицательные образцы, охарактеризованные не только с помощью полимеразной цепной реакции, но и другими методами диагностики данной инфекции.

2) Следует периодически проводить оценку чувствительности диагностических наборов на основе полимеразной цепной реакции (рис. 1).



Рис. 1. Оборудования для ПЦР

1 – Термостат «гном» (программируемый); 2 – Амплификатор детектирующий ДТпрайм (DTprime); 3 – Бокс лабораторный для ПЦР; 4 – Система ПЦР в реальном времени DTlite; 5 - Термостат твердотельный ТТ-1-ДНК-Технология, программируемый, малогабаритный; 6 – Высокоскоростная мини-центрифуга.

МЕХАНИЗМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

1. Основные компоненты

Для проведения ПЦР необходимо наличие в реакционной смеси (РС) ряда основных компонентов.

Праймеры – искусственно синтезированные олигонуклеотиды, имеющие, как правило, размер от 15 до 30 нуклеотидов, идентичные (комплементарные) противоположным концам противоположных цепей искомого участка ДНК-мишени. Служат затравкой для синтеза

комплементарной цепи с помощью ДНК-полимеразы и играют ключевую роль в образовании и накоплении продуктов реакции амплификации.

Правильно подобранные праймеры обеспечивают специфичность и чувствительность тест-системы и должны отвечать ряду критериев:

- ▶ быть специфичными. Особое внимание уделяют 3'-концам праймеров, так как именно с них Taq-полимераза начинает достраивать комплементарную цепь ДНК. При недостаточной специфичности праймеров в процессе ПЦР будут образовываться продукты, которые, с одной стороны, могут быть идентифицированы как ложноположительный результат, а с другой стороны, на процессы их накопления будут расходоваться компоненты реакционной смеси, что приведёт к значительной потере чувствительности реакции как таковой;

- ▶ не должны образовывать димеры и петли – устойчивые двойные цепи – при отжиге праймеров самих на себя или друг с другом;

- ▶ область отжига праймеров должна находиться вне зон мутаций, делеций или инсерций в пределах видовой или иной специфичности, взятой в качестве критерия при выборе праймеров. При попадании в такую зону не происходит отжига праймеров и, как следствие, возникает ложноотрицательный результат.

Буфер – смесь катионов и анионов в определённой концентрации, обеспечивающей оптимальные условия для реакции, а также стабильное значение рН.

Анализируемый образец – подготовленный к внесению в реакционную смесь препарат, который может содержать искомую нуклеиновую кислоту, например, ДНК микроорганизмов, служащую мишенью для последующего многократного копирования. При отсутствии НК-мишени специфический продукт амплификации не образуется.

2. Дополнительные компоненты

Для удобства детекции и контроля эффективности амплификации в состав реакционной смеси могут быть включены дополнительные компоненты.

А) Положительный контроль

Положительный контрольный образец (ПКО) представляет собой искусственно синтезированную олигонуклеотидную последовательность, строго соответствующую искомой. Соответственно, праймеры для ПКО и искомой мишени одинаковые, что позволяет удостовериться в работоспособности и сохранности компонентов РС, необходимых для нормального прохождения ПЦР.

Б) Отрицательный контроль

Отрицательный контрольный образец (ОКО) включает в себя все компоненты реакции, но вместо клинического материала или препарата НК вносится соответствующее количество деионизованной воды или экстракта, не содержащего исследуемую ДНК. Отрицательный контроль необходим для проверки компонентов реакции на отсутствие в них ДНК или клеток возбудителя вследствие контаминации и исключения учёта ложноположительных результатов.

В) Внутренний контроль

Препарат НК может содержать примеси ингибиторов, которые заметно снижают эффективность ПЦР, а в некоторых случаях могут приводить к полному отсутствию результатов исследования. Кроме того, возможны ошибки на этапе составления РС (например, не добавили какой-либо компонент или саму НК), несоблюдение температурного режима хранения наборов реагентов или отдельных их частей (например, размораживание и потеря активности ферментов) и ряд других технических моментов, которые

напрямую влияют на результаты ПЦР. Поэтому становится необходимым контролировать ход амплификации в каждой пробирке с реакционной смесью. Для этого в состав РС вводят дополнительный внутренний контроль (ВК).

ВК – это искусственно сконструированный препарат ДНК или РНК, который имеет принципиально отличную от искомой олигонуклеотидную последовательность. Для ВК в состав РС вводят собственные, строго комплементарные праймеры. Концентрация ВК в РС должна быть такой, чтобы не составлять конкуренции для амплификации даже единичных искомых молекул НК.

Работа 44. Основные этапы ПЦР

Если в анализируемом образце присутствует искомая ДНК, то в процессе реакции амплификации с ней происходят изменения, которые обеспечиваются определёнными температурными циклами. Каждый цикл амплификации состоит из трёх этапов (рис. 2):

1. Денатурация – это переход ДНК из двухнитевой формы в однонитевую при разрыве водородных связей между комплементарными парами оснований противоположных цепей ДНК под воздействием высоких температур.

2. Отжиг – это присоединение праймеров к одноцепочечной ДНК-мишени. Праймеры подбирают так, чтобы они ограничивали искомый фрагмент ДНК и были комплементарны противоположным цепям ДНК. Отжиг происходит в соответствии с правилом комплементарности Чаргаффа. Если это условие не соблюдено, то отжига праймеров не происходит.

3. Элонгация (синтез). После отжига праймеров Таq-полимераза начинает достраивание второй цепи ДНК с 3'-конца праймера с использованием дНТФ.

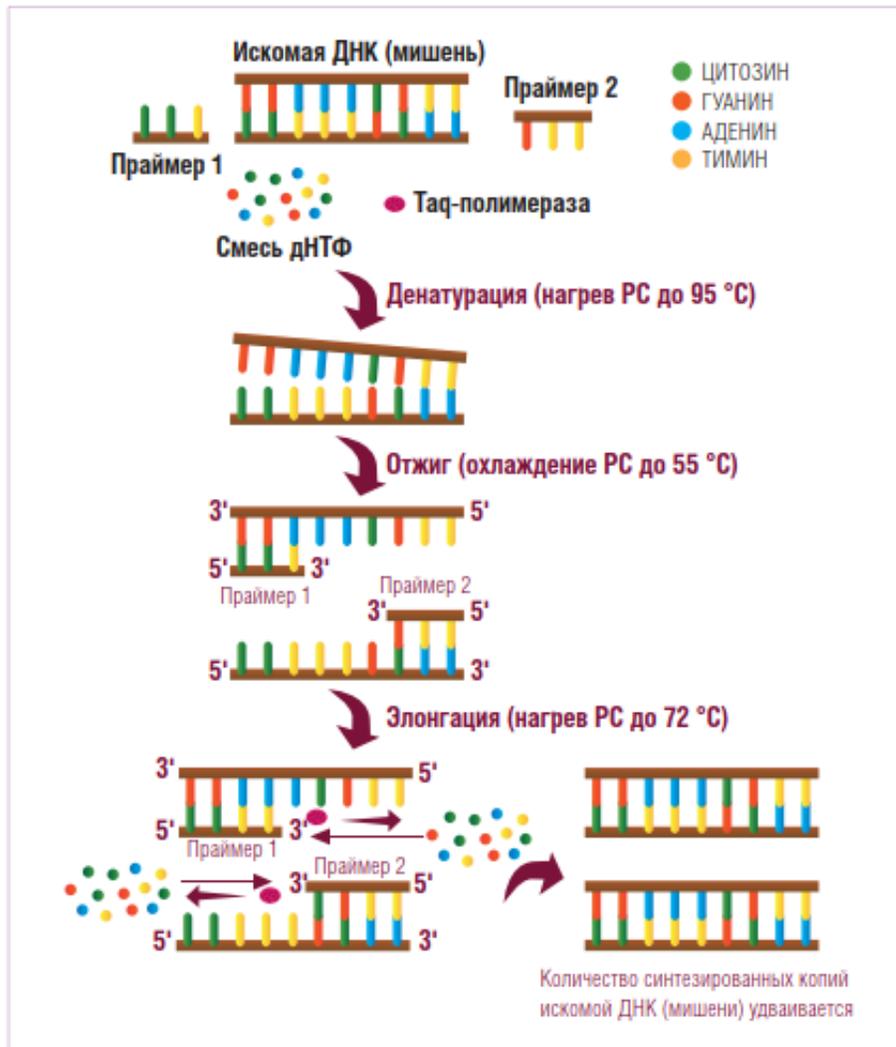


Рис. 2. Основные этапы ПЦР

Температурный цикл амплификации многократно повторяется (30 и более раз). На каждом цикле количество синтезированных копий фрагмента ДНК удваивается (рис. 3).

Эффект плато. Процесс накопления специфических продуктов амплификации по геометрической прогрессии идёт лишь ограниченное время, а затем его эффективность критически падает – проявляется эффект плато.

Термин «эффект плато» используют для описания процесса накопления продуктов ПЦР на последних циклах амплификации, когда количество ампликонов достигает 0,3–1 пмоль.

На достижение эффекта плато влияют:

- ▶ утилизация субстратов (дНТФ и праймеров);
- ▶ стабильность реагентов (дНТФ и фермента);
- ▶ количество ингибиторов, включая пирофосфаты и ДНК-дуплексы;
- ▶ неспецифические продукты и праймер-димеры, конкурирующие за праймеры, дНТФ и полимеразу;
- ▶ концентрация специфического продукта за счёт неполной денатурации при высокой концентрации ампликонов.

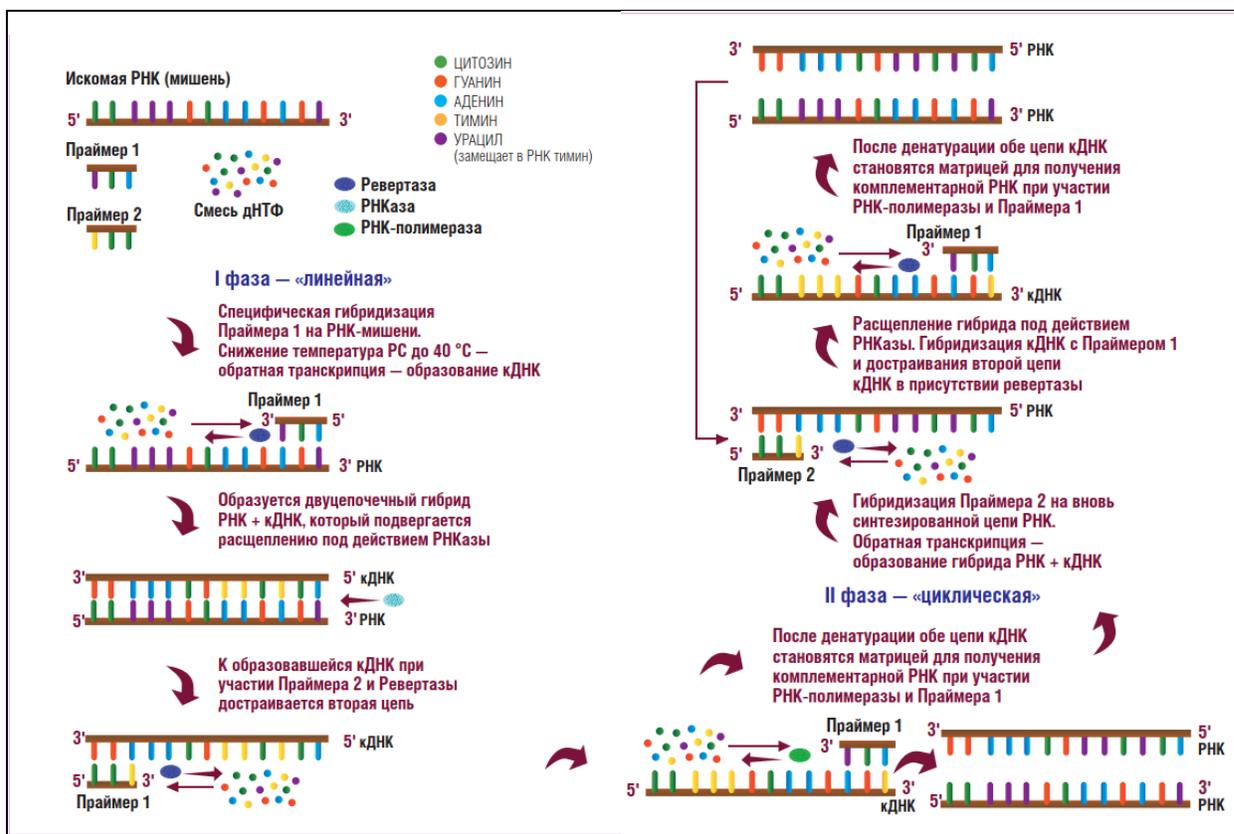


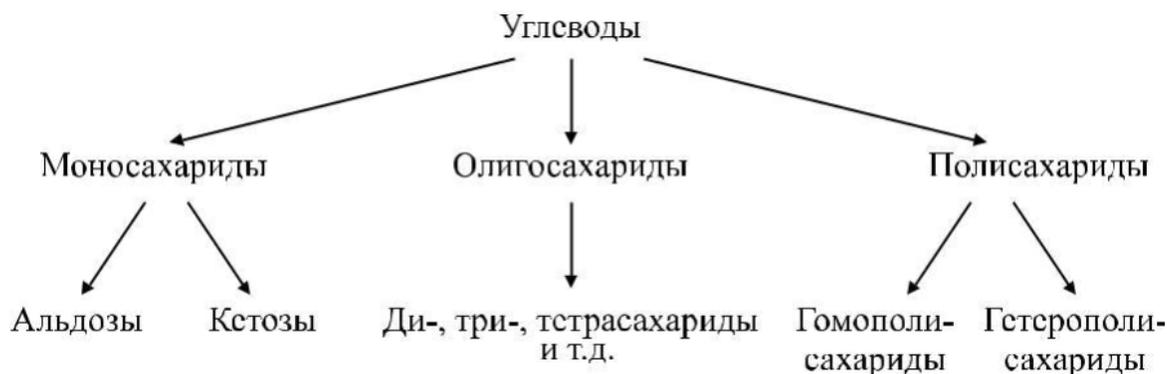
Рис. 3. Основные этапы технологии

Вывод. На сегодняшний день метод ПЦР имеет огромное научное и прикладное значение: с его помощью реализованы масштабные исследования в области медицины и биологии, совершён прорыв в диагностике широкого спектра инфекционных и генетических заболеваний, онкопатологий.

3.7 ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ УГЛЕВОДОВ

Углеводы входят в состав клеток и тканей всех растительных и животных организмов. По массе углеводы составляют основную часть органического вещества на земле. Углеводы в живой природе имеют большое значение как источники запасной энергии в метаболических процессах: крахмал — в растениях; гликоген — в животных. Углеводы служат строительным материалом для многих организмов: целлюлоза — клеточные стенки растений, мурамин — бактерий, хитин — грибов и т. д. Углеводы являются составными частями важнейших веществ, таких как нуклеиновые кислоты, липиды, белки, выполняющих в организме сложные и важные функции.

Углеводы составляют обширную группу соединений, которая делится на моносахариды (простые сахара) и продукты их конденсации олиго- и полисахариды- (сложные сахара). Моносахариды — это простейшие углеводы, не подвергающиеся гидролизу. Сложные углеводы способны гидролизоваться. Олигосахаридами называются углеводы, гидролизующийся с образованием 2–10 молекул моносахаридов. Полисахариды — высокомолекулярные углеводы, при гидролизе которых образуются сотни и тысячи молекул моносахаридов.



Цель раздела: ознакомиться с качественными и количественными реакциями на восстановления свойства моносахаридов, дисахаридов и полисахаридов.

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА УГЛЕВОДЫ

Восстанавливающие свойства моносахаридов.

Реакции окисления являются важнейшими в химии углеводов, их используют в биохимических анализах для обнаружения моносахаридов (в частности, глюкозы) в биологических жидкостях (моче, крови).

В зависимости от условий окисления моносахаридов образуются различные продукты. В щелочной среде альдозы способны восстанавливать катионы металлов- (меди, серебра, висмута), соли при этом окисляются с образованием различных продуктов окисления.

Для обнаружения моносахаридов применяют реактивы Толлена, Бенедикта, Фелинга. Принцип действия этих реактивов одинаков и основан на восстановлении двухвалентной меди до одновалентной.

Восстанавливающие свойства дисахаридов

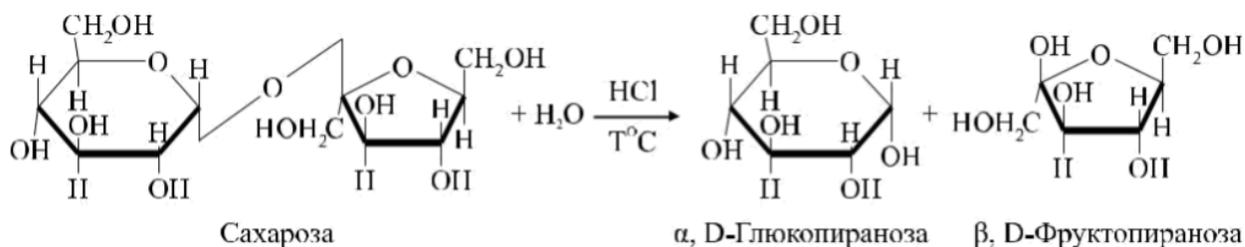
Восстанавливающие дисахариды, имеющие свободный гликозидный гидроксил, способны окисляться до соответствующих кислот, участвуя в реакциях, характерных для альдоз.

Невосстанавливающиеся дисахариды, не имеющие свободного гликозидного гидроксила, в такие реакции не вступают. Наиболее широко для обнаружения невосстанавливающихся дисахаридов используют методы, в основе которых лежит гидролиз дисахаридов с последующим обнаружением продуктов гидролиза.

А. Восстанавливающая способность лактозы и мальтозы. Благодаря наличию свободной альдегидной группы в молекуле лактозы (в остатке

глюкозы) и мальтозы (у второго остатка глюкозы) эти дисахариды обладают редуцирующими свойствами и способны участвовать в реакциях восстановления: Троммера, Фелинга, Толленса и т. д.

Б. Гидролиз сахарозы и открытие продуктов гидролиза. В молекуле сахарозы связь между остатками глюкозы и фруктозы образуется за счёт двух гликозидных гидроксильных групп. Сахароза не обладает восстанавливающими свойствами. После гидролиза сахарозы образуются моносахариды, которые можно обнаружить, например, реакцией Троммера глюкозу, а реакцией Селиванова — фруктозу.



Восстанавливающие свойства полисахаридов

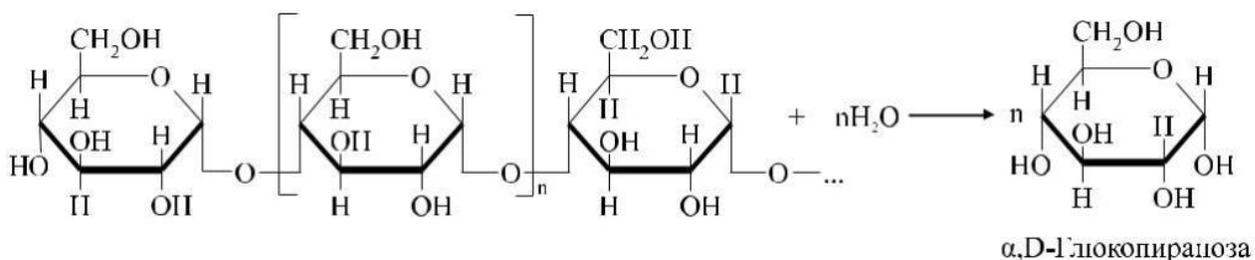
Полисахариды отличаются друг от друга химической природой повторяющихся моносахаридных единиц, степенью разветвления и длиной цепи. Полисахариды содержат редуцирующий гликозидный гидроксид на конце цепи и поскольку доля его относительно всей микромолекулы весьма невелика, то полисахариды не проявляют восстановительных свойств.

А. Реакция крахмала и гликогена с йодом. При взаимодействии крахмала и гликогена с йодом образуются комплексные адсорбционные соединения, окрашенные в реакции с крахмалом в синий цвет, а с гликогеном — в красно-бурый. Различие в цвете комплексов обусловлено химической структурой крахмала и гликогена.

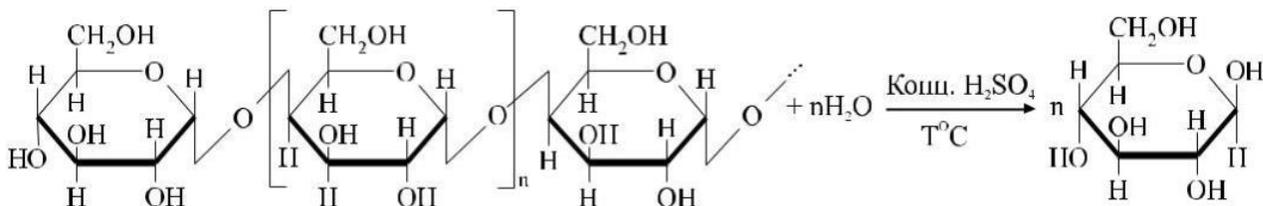
При нагревании окраска исчезает, но появляется опять при охлаждении,

что свидетельствует об образовании нестойких комплексов крахмала и гликогена с йодом. Обесцвечивание происходит также при добавлении гидроксида натрия или калия. Исчезновение окраски при нагревании и добавлении щелочей обусловлено тем, что в образовании комплексов принимает участие молекулярный йод, а не йодид-ионы.

Б. Гидролиз крахмала и обнаружение продуктов гидролиза. При нагревании крахмала с минеральными кислотами происходит полный гидролиз с образованием глюкозы, которую можно обнаружить качественными реакциями.



В. Гидролиз целлюлозы и обнаружение продуктов гидролиза. Целлюлоза не расщепляется ферментами желудочно-кишечного тракта человека. Гидролиз целлюлозы минеральными кислотами происходит значительно медленнее, чем крахмала, и требует предварительной обработки целлюлозы 80% раствором серной кислоты.



Оснащение работы:

Биоматериал	Приборы и оборудование	Реактивы
Пищевые углеводы	Штативы с пробирками, стеклянные палочки, пипетки градуированные, часы, капельницы, горелки, термостат, термометр.	Глюкоза (5%); гидроксид натрия (5%); сульфат меди (5%); нитрат серебра (5%); водный раствор аммиака (10%); реактив Фелинга ^{1, 2, 3} ; мальтоза (5%); лактоза (5%); сахароза (5%); соляная кислота (конц. и 25%); кристаллический резорцин, кристаллический бикарбонат натрия; крахмал (0,1% и 1%); гликоген (0,1%); гидроксид натрия (10%); реактив Люголя ⁴ ; вата (источник клетчатки); серная кислота (80% и 3%); кристаллический гидрокарбонат натрия.

¹ 200 г сегнетовой соли и 150 г гидроксида натрия растворяют в дистиллированной воде и доводят объём до 1 л;

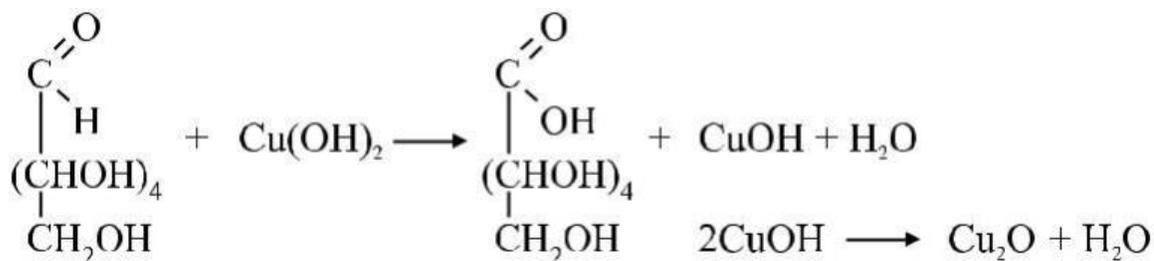
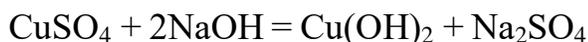
² 40 г перекристаллизованного сульфата меди растворяют в дистиллированной воде и доводят объём до 1 л.

³ Равные объёмы растворов 1 и 2 смешивают перед началом работы.

⁴ 1 г йода и 2 г йодида калия растворяют в 15 мл дистиллированной воды и затем доводят водой объём до 300 мл.

Пошаговое проведение работы:

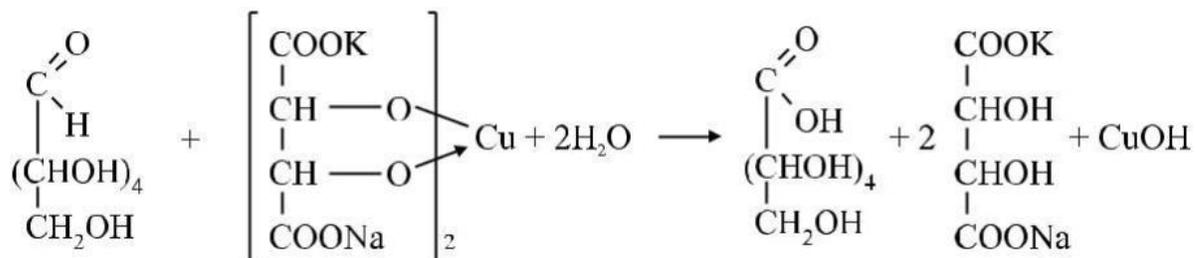
Работа 45. Реакция Троммера.



1. В чистую, сухую пробирку приливают 3 мл 5% раствора глюкозы.
2. Прибавляют 1 мл 5% раствора щелочи и 5 капель 5% раствора сульфата меди.
3. Содержимое пробирки окрашивается в голубой цвет. Осторожно нагревают содержимое пробирки до кипения.

Наблюдают выпадение жёлтого осадка гидроксида меди (I) или красного осадка оксида меди (I).

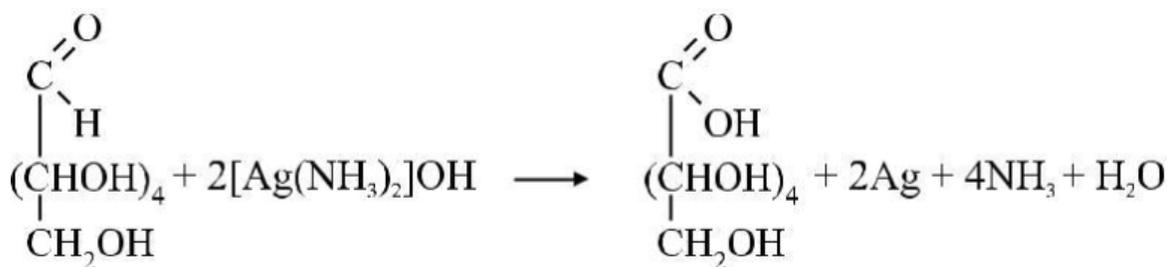
Работа 46. Реакция Фелинга



1. В чистую, сухую пробирку приливают 2 мл 5% раствора глюкозы.
2. Добавляют равный объем реактива Фелинга и нагревают пробирку до кипения.

Наблюдают появление красного осадка.

Работа 47. Реакция серебряного зеркала по Толленсу



1. В чистую, сухую пробирку наливают 1 мл раствора нитрата серебра.
2. Добавляют 1 мл раствора гидроксида натрия и по каплям водный раствор аммиака до растворения образующегося серого осадка.
3. Затем к содержимому пробирки добавляют 3 мл раствора глюкозы.

4. Перемешивают и осторожно нагревают в пламени горелки до появления бурого окрашивания.
5. Далее реакция идёт без нагревания.

Наблюдают выпадение металлического серебра в виде чёрного осадка или его осаждения на стенках пробирки в виде блестящего зеркального налёта.

Восстанавливающие свойства дисахаридов

Пошаговое проведение работы:

Работа 48. Реакция Троммера. Восстанавливающая способность лактозы и мальтозы

1. В чистую, сухую пробирку наливают 2 мл 5% раствора лактозы.
2. Во вторую пробирку — 2 мл 5% раствора глюкозы.
3. В обе пробирки затем приливают по 1 мл раствора гидроксида натрия и по 5 капель раствора сульфата меди.
4. Пробирки осторожно нагревают в пламени горелки.

Наблюдают образование красного осадка.

Работа 49. Реакция гидролиза сахарозы и открытие продуктов гидролиза

1. В две пробирки наливают по 6 мл 5% раствора сахарозы.
2. В одну из них добавляют 1 мл концентрированной соляной кислоты.
3. Вторая пробирка контрольная.
4. Обе пробирки выдерживают в термостате при температуре 100°C в течение 5 минут.
5. После охлаждения гидролизат нейтрализуют сухим бикарбонатом натрия, добавляя его небольшими порциями до тех пор, пока не прекратится выделение углекислого газа.

6. Затем с опытным и контрольным растворами проводят реакции Троммера и Селиванова.

Отмечают изменение окраски в гидролизатах и отсутствие таковой в контрольных пробах.

Восстанавливающие свойства полисахаридов

Пошаговое проведение работы:

Работа 50. Реакция крахмала и гликогена с йодом

1. Берут две чистые, сухие пробирки.
2. В одну пробирку помещают 2 мл 0,1 % раствора крахмала.
3. В другую пробирку — 2 мл 0,1 % раствора гликогена.
4. Затем в обе пробирки вносят по 1–2 капли реактива Люголя.
5. Содержимое пробирок перемешивают и наблюдают появление окрашивания.
6. Затем из каждой пробирки отливают по 1 мл в две другие пробирки.
7. Одну пару пробирок помещают в термостат при 100°C, а в другую пару добавляют по 1 мл 10 % раствора гидроксида натрия.
8. Наблюдают исчезновение окраски.
9. Пробирки из термостата охлаждают.
Наблюдают вновь появление окраски.

Работа 51. Гидролиз крахмала и обнаружение продуктов гидролиза

1. В две пробирки помещают по 5 мл 1 % раствора крахмала.
2. В одну пробирку добавляют 1 мл концентрированной соляной кислоты.
3. Вторая пробирка является контрольной.
4. Помещают пробирки в термостат при 100°C на 15 минут.

5. Затем в обеих пробирках проводят реакцию Троммера или Фелинга.

Наблюдают изменение окраски в пробирке с гидролизатом и отсутствие таковой в контрольной пробе.

Работа 52. Гидролиз целлюлозы и обнаружение продуктов гидролиза

1. Берут две чистые, сухие пробирки.
2. Небольшое количество ваты (100–200 мг) помещают в одну пробирку.
3. Заливают 3 % раствором серной кислоты и кипятят 10–15 минут.
4. В другой пробирке такое же количество ваты обрабатывают небольшим количеством 80 % раствора серной кислоты (около 0,5 мл) до полного растворения ваты.
5. Затем добавляют дистиллированную воду (примерно 0,5–1 мл) и кипятят 5 минут.
6. После охлаждения содержимое пробирок нейтрализуют бикарбонатом натрия и проводят реакцию Фелинга.

Примечание: Положительная реакция Фелинга свидетельствует о том, что произошёл гидролиз целлюлозы и образовался восстанавливающий продукт — β -D-глюкопираноза.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ УГЛЕВОДОВ

Для количественного определения моносахаридов в крови используются редуктометрические, фотоколориметрические, энзиматические методы.

Редуктометрические методы основаны на восстановительных свойствах моносахаридов. Недостаток этих методов состоит в том, что они неспецифичны, так как присутствующие в крови редуцирующие вещества, не

являющиеся углеводами, также обладают восстанавливающими свойствами, и полученные результаты включают всю сумму восстанавливающих соединений в крови.

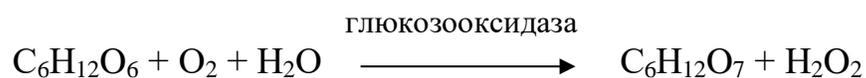
Фотоколориметрические методы основаны на определении степени интенсивности окраски соединений, образующихся при взаимодействии моносахаридов с определёнными веществами. Метод специфичен и точен.

Энзиматические методы основаны на доставке фермента глюкозооксидазы, окисляющей глюкозу до глюконовой кислоты кислородом воздуха. Этот метод специфичен и широко применяется в клинико-диагностических лабораториях.

Определение содержания фруктозы в сыворотке крови фотоколориметрическим методом. Определение фруктозы основано на превращении фруктозы в 5-гидроксиметилфурфурол, образующий с резорцином окрашенный продукт. Хотя реакцию Селиванова дают также и альдогексозы (например, глюкоза), скорость образования оксиметилфурфуrolа из фруктозы во много раз больше, что и обуславливает специфичность этой реакции для фруктозы.

Содержимое фруктозы вычисляют на основе измерения оптической плотности окрашенных растворов продуктов конденсации оксиметилфурфуrolа и резорцина при 490–510 нм на фотоэлектроколориметре. В крови взрослого человека содержится 0,1–0,5 мг/100мл (5,55–27,75 мкмоль/л) фруктозы.

Определение глюкозы энзиматическим методом. Метод основан на каталитическом действии глюкозооксидазы, ускоряющей окисление глюкозы кислородом воздуха до глюконовой кислоты:



Образующийся в эквимольном количестве пероксид водорода под действием пероксидазы разлагается, а выделившийся атомарный кислород окисляет добавленный к реакционной смеси хромогенный кислородный акцептор (о-толидин). Количественное определение глюкозы сводится к измерению оптической плотности образовавшегося в опыте, окрашенного в синий цвет соединения.

Этот метод предназначен для специфического определения содержания глюкозы в биологических жидкостях после удаления белков в присутствии других сахаров и редуцирующих веществ не углеводной природы.

Оснащение работы:

Биоматериал	Приборы и оборудование	Реактивы
Сыворотка крови	Фотоэлектроколориметр, центрифуга, пробирки химические и центрифужные, воздушные обратные холодильники, колбы мерные на 100 мл, пипетки на 2, 5, 10 мл, микропипетки, термостат, секундомер.	Резорцин (0,1% в 95% этаноле); соляная кислота (10 н.); стандартный раствор фруктозы ¹ ; хлорная кислота 0,1 н; сульфат цинка (5%); гидроксид натрия (0,3 н.); хлорид натрия (0,9 %); о-толидин (1%, перекристаллизованный в абсолютном этаноле); ацетатный буфер (0,25 н., рН 4,8) ² ; стандартный раствор глюкозы (50, 100, 200 мкг/мл), приготовленный на насыщенном водном растворе бензойной кислоты; рабочий реактив ³ .

¹ 0,25 г фруктозы, взятые с точностью 10–4 г, растворяют в 100 мл воды в мерной колбе.

² 4 части уксусной кислоты (0,25 н.) смешивают с 6 частями ацетата натрия (0,25 н.).

³ К 70–80 мл 0,25 н. ацетатного буфера (рН 4,8) добавляют 2 мг препарата глюкозооксидазы и 1 мг сухой кристаллической пероксидазы. Смесь перемешивают, приливают 1 мл 1% раствора о-толидина и доводят объем до 100 мл ацетатным буфером. Реактив готовят за 1–2 часа до употребления. Рабочий реактив можно хранить в темной склянке с притёртой пробкой в холодильнике в течение 1,5–2 месяцев.

Пошаговое проведение работы:

Работа 53. Определение содержания фруктозы в сыворотке крови фотоколориметрическим методом.

1. Берут обычные три чистые, сухие пробирки (№1, 2, 3) и одну центрифужную пробирку.
2. В центрифужную пробирку вносят 0,1 мл сыворотки крови, затем 2,5 мл 1 н. раствора хлорной кислоты (HClO_4).
3. Перемешивают, выдерживают 15 минут, после чего центрифугируют 5 минут при 5 000 об./мин.
4. И первую обычную пробирку вносят 1 мл центрифугата.
5. Во вторую пробирку — 1 мл смеси, состоящей из 0,1 мл стандартного раствора фруктозы и 2,5 мл 1 н. раствора хлорной кислоты.
6. В третью пробирку (контроль) — 1 мл смеси, состоящей из 0,1 мл дистиллированной воды и 2,5 мл 1 н. раствора хлорной кислоты.
7. Во все три пробирки приливают по 1 мл 0,1% спиртового раствора резорцина и 3 мл 10 н. раствора соляной кислоты.
8. Закрывают пробками с воздушным холодильником и ставят в термостат при 80°C .
9. Через 8 минут быстро охлаждают водопроводной водой.
10. Выдерживают при комнатной температуре 5 минут.
11. Затем измеряют оптическую плотность содержимого пробирок № 1 и 2 против контроля (пробирка № 3) при 490–510 нм в кювете шириной 1 см (или 0,5 см).
12. Содержание фруктозы в сыворотке крови рассчитывают по формуле:

$$C = E_1 \cdot a / E_2,$$

где E_1 — оптическая плотность сыворотки крови, E_2 — оптическая плотность стандартного раствора фруктозы, a — количество фруктозы в пробе стандартного раствора (в мкг).

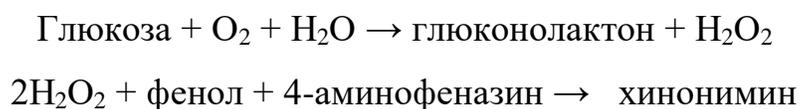
Работа 54. Определение глюкозы энзиматическим методом.

1. Берут обычные три чистые, сухие пробирки (№1, 2, 3) и одну центрифужную пробирку.
2. Осаждают белок из анализируемой биологической жидкости (кровь, сыворотка крови, гемолимфа). Для этого в центрифужной пробирке смешивают 0,4 мл 5% раствора сульфата цинка, 0,4 мл 0,3 н. раствора гидроксида натрия и 1,1 мл 0,9% раствора хлорида натрия.
3. Затем добавляют 0,1 мл исследуемой биологической жидкости.
4. Содержимое пробирки тщательно перемешивают и центрифугируют при 5 000 об./мин. в течение 10–15 минут.
5. Из центрифужной пробирки переносят в химическую пробирку 1 мл надосадочной жидкости и приливают 3 мл рабочего реактива для определения глюкозы.
6. Одновременно в три пробирки приливают по 1 мл стандартного раствора глюкозы соответственно 50, 100, 200 мкг/мл.
7. В две пробирки (контрольные) — по 1 мл воды.
8. Затем во все пробирки с интервалом в 2 минуты приливают по 3 мл рабочего реактива. Эту последовательность следует соблюдать (интервал 2 минуты) и при измерении оптической плотности растворов.
9. Через 10 минут после добавления рабочего реактива измеряют оптическую плотность исследуемого и стандартных растворов против контроля на фотоэлектроколориметре при красном светофильтре (620 нм).

На основании полученных величин оптической плотности для всех стандартных растворов глюкозы строят стандартную кривую, по которой рассчитывают количество глюкозы в исследуемой биологической жидкости.

Работа 55. МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ В КРОВИ ГЛЮКОЗОКСИДАЗНЫМ МЕТОДОМ

Принцип метода. Глюкозооксидаза специфически катализирует перенос двух водородных атомов с первого углеродного атома глюкозы на кислород воздуха. При этом в ходе реакции образуется в эквимольных количествах перекись водорода, которая разлагается вторым ферментом – пероксидазой, а выделяющийся в процессе реакции атомарный кислород окисляет имеющийся реакционный смесь «фенол + аминофеназин» с образованием хинонимина. При этом хинонимин (квининоминовый краситель) приобретает окраску, интенсивность окраски пропорциональна содержанию глюкозы.



Оснащение работы:

Оборудование	Посуда	Реактивы
ФЭК	Центрифужные пробирки	Дистиллированная вода
Центрифуга	Высокие пробирки	Рабочий глюкозовый реактив
Термостат	Пипетки на 2,0 мл	Стандартный раствор глюкозы
	Микропипетки на 0,1 мл	
	Кварцевые кюветы 10 мм	

Взятие биоматериала. Забор крови производят натощак после 6-8 часового голодания, шприцем из вены в сухую центрифужную пробирку в количестве 1,0-2,0 мл.

1. Кровь оставляют на 10 мин, затем иглой осторожно отслаивают содержимое пробирки от стенок.

2. Центрифугируют 10 минут при 1500 об/мин

3. Берут сыворотку в отдельную пробирку. Сыворотка может храниться в замороженном состоянии 1 мес.

4. Для анализа используют 0,02 мл сыворотки.

Ход работы. В три пробирки отмеривают по 2 мл глюкозового реактива. В первую пробирку прибавляют 0,02 мл сыворотки крови (исследуемая проба), во вторую – 0,02 мл стандартного раствора глюкозы (стандартная проба) и в третью – 0,02 мл дистиллированной воды (контроль). Все пробы перемешивают и инкубируют в течении 15 минут при температуре 37°C. Затем измеряют оптическую плотность пробы и стандарта против контрольного раствора. Светофильтр синий (425-500 нм) в кюветах с рабочим расстоянием 10 мм.

Схема определения глюкозы в сыворотке крови

№ пробы	Глюкозовый реактив (мл)	Стандартный р-р глюкозы (мл)	Исследуемая проба (мл)	H ₂ O (мл)	Условия опыта	Оптическая плотность
1	2,0	0,2	-	-	Термостатирование, °C, мин	E _{ст}
2	2,0	-	0,2	-		E _{оп}
3	2,0	-	-	0,2		-

Пошаговое проведение методики

1. Берут три сухие пробирки и нумеруют их (№1, №2, №3).
2. Во все три пробирки наливают по 2,0 мл рабочего глюкозного реактива.
3. В пробирку №1 (исследуемая проба) микропипеткой набирают 0,02 мл сыворотки.
4. В пробирку №2 (стандартная проба) микропипеткой набирают 0,02 мл стандартного раствора глюкозы.
5. В пробирку №3 (контрольная проба) микропипеткой набирают 0,02 мл дист. воды.

6. Перемешивают содержимое каждой пробирки.
7. Термостатируют все пробы при 37 °С в течение 15 минут.
8. Измеряют оптическую плотность (E) на ФЭКе:
 - А) устанавливают синий светофильтр при длине волны 425-500 нм;
 - Б) оптическую плотность контрольной пробы принимают за ноль;
 - В) измеряют оптическую плотность стандарта против контроля (E_{ст});
 - Г) измеряют оптическую плотность опыта против контроля (E_{оп});
9. Расчёт проводят по формуле:

$$C_{\text{оп}} \text{ (ммоль/л)} = (E_{\text{оп}}/E_{\text{ст}}) * 10,$$

где C_{оп} - концентрация глюкозы в исследуемой пробе в ммоль/л; C_{ст} - концентрация глюкозы в стандартном растворе 10 ммоль/л; E_{оп} - оптическая плотность раствора исследуемой пробы; E_{ст} - оптическая плотность раствора стандартной пробы.

Клинико-диагностическое значение. Уровень глюкозы в крови регулируется нейрогуморальным путём. При целом ряде состояний наблюдается повышение содержания глюкозы в крови - гипергликемия, а также понижение концентрации глюкозы – гипогликемия.

В норме содержание глюкозы в крови составляет 3,3—5,6 ммоль/л.

Сразу же после рождения уровень глюкозы в крови детей соответствует её содержанию в плазме крови матери. Однако уже в первые часы жизни концентрация глюкозы в крови падает, достигая на вторые сутки 2,5 ммоль/л; к 5—6 суткам концентрация глюкозы крови увеличивается. Постепенное её возрастание происходит и в дальнейшем, но лишь к 15-ти годам концентрация глюкозы достигает значений, характерных для взрослого человека.

Вид материала	Уровень глюкозы (ммоль/л)
Кровь из пуповины	2,50 - 5,33
Недоношенные	1,11 - 3,33
Новорождённые	1,67 - 3,33
Новорождённые 1 сут жизни	2,22 - 3,33
Новорождённые старше 1 дня	2,78 - 4,44
Дети 1 год-14 лет	3,33 - 5,55
Взрослые	3,3 - 5,6

Согласно рекомендациям ВОЗ (1998), нормальный уровень глюкозы крови – 3,3 - 5,6 ммоль/л. Увеличение этого показателя на 0,4 ммоль – т.е. до 6,0 ммоль/л указывает на риск развития сахарного диабета, а при уровне 6,0-7,2 ммоль/л констатируют латентный и компенсированный диабет, при глюкозе крови более 7,2 ммоль/л диагностируют некомпенсированный сахарный диабет.

Увеличение глюкозы в крови происходит при поражениях эндокринной системы: сахарном диабете, феохромоцитоме, тиреотоксикозе, акромегалии, гигантизме, синдроме Кушинга, соматостатиноме. Гипергликемия возникает при кратковременной физической нагрузке, сильном эмоциональном возбуждении, стрессе, шоке, ожогах, поражениях центральной нервной системы, вызванных травмой, опухолью головного мозга. Гипергликемия сопровождает течение острого и хронического панкреатита, вызванного эпидемическим паротитом, муковисцедоза, гемохроматоза, может наблюдаться при кровоизлиянии в мозг, стенокардии, хронических заболеваниях печени и почек, энцефалопатии Вернике (дефицит В₁). Содержание глюкозы в крови увеличивается при

повышенном выбросе адреналина в момент медицинских манипуляций, что необходимо учитывать у детей.

Уровень глюкозы в крови увеличивается после приёма кофеина, адреналина, стрихнина, употребления наркотических и снотворных веществ - эфира, опия, морфия, веронала, хлороформа; после приёма эстрогенов, индометацина, пероральных контрацептивов, больших доз никотиновой кислоты, диуретиков: фуросемида, триамтерена, хлорталидона.

Прием углеводов с пищей повышает концентрацию глюкозы в крови — «алиментарная» гипергликемия. Уровень глюкозы начинает возрастать спустя 10-15 мин после приёма пищи, а через час обычно достигает 8,9 — 9,9 ммоль/л; затем (по прошествии 2—2,5 ч) возвращается к исходному или даже несколько более низкому уровню. Непродолжительная физическая нагрузка повышает содержание глюкозы в крови, а длительная, наоборот, понижает её концентрацию.

Понижение глюкозы крови наблюдается при инсуломе, дефиците глюкагона, раке надпочечников, желудка, фибросаркоме, отравлении мышьяком, тетрахлоридом углерода, фосфором, алкоголем, салицилатами, антигистаминными препаратами. Также гипогликемия характерна для гипопитуитаризма, аддисоновой болезни, гипотиреоза, для гликогенозов — болезнь Гирке, болезни кленового сиропа, галактоземии, некоторых форм поражения почек, тонкого кишечника, удалении значительной части желудка.

Если определение глюкозы в крови и моче не выявляет существенных отклонений от нормы, для подтверждения диагноза заболеваний, связанных с нарушением углеводного обмена, прибегают к постановке **тестов толерантности к глюкозе**.

Проба с однократной нагрузкой заключается в определении содержания глюкозы натощак и через 2 ч после приёма пищи — завтрака,

равноценного по содержанию 100 г углеводов. Уровень глюкозы через 2 ч после приёма этой порции углеводов должен быть меньше, чем 6,7 ммоль/л. В противном случае есть основание предполагать сахарный диабет.

Время, ч	Лица до 50 лет, глюкоза крови, ммоль/л			Лица старше 50 лет, глюкоза крови, ммоль/л		
	норма	диабет	тест сомнительный	норма	диабет	тест сомнительный
1	до 8,8	Более 9,9	8,8-9,9	До 9,8	Более 11,0	9,8 -11,0
2	до 6,6	Более 7,7	6,6-7,7	До 7,7	Более 8,8	7,7 - 8,8

Для трактовки гликемических кривых, отражающих характер подъёма и падения уровня глюкозы во времени, предложено вычислять различные коэффициенты. Гликемический коэффициент Бодуэна, представляет собой отношение показателя наибольшего повышения концентрации глюкозы в крови к исходному уровню, т.е. к цифре концентрации глюкозы натощак ($K = B/A$, где B – максимальный, A – исходный уровень глюкозы, K – коэффициент Бодуэна. В норме он равен 1,3-1,5). Постгликемический коэффициент Рафальского – это частное от деления показателя содержания глюкозы в крови, определённого через 2 ч после нагрузки (т.е. приёма углеводов), на цифру, отражающую исходный уровень глюкозы (т.е. замеренный натощак). У практически здоровых людей постгликемический коэффициент Рафальского составляет 0,9-1,04.

При сахарном диабете, повышенной функции передней доли гипофиза, щитовидной железы, коры и мозгового вещества надпочечников, поражении центральной и расстройстве вегетативной нервной системы, инфекционных и воспалительных заболеваниях, токсикозах (беременных), панкреатите и др. наблюдается высокий подъем и замедленное возвращение гликемической кривой к исходному уровню.

В случаях потенциального, латентного сахарного диабета с субклиническим, асимптоматическим его течением уровень глюкозы в крови обычно не выходит за пределы физиологических колебаний, но может повышаться под влиянием психической или физической травмы, интоксикаций, беременности и т.д.

В последнее время установлено, что тест толерантности к глюкозе (сахарная нагрузка) не может быть использован у пациентов с глюкозой крови более 6,0 ммоль/л, он не всегда безопасен для больных. В связи с чем лучше проводить измерение количества гликозилированного гемоглобина HbA_{1c}, свидетельствующего о стойкой гипергликемии и фруктозамина – гликозилированного альбумина.

Гликозилированный гемоглобин образуется вследствие неферментативного присоединения глюкозных остатков к белку гемоглобину (по аминокетаминным группам лизина) с образованием кетаминного продукта. Отражает наличие стойкой повторяющейся гипергликемии. В норме у здоровых людей процент гликозилирования белков сыворотки крови составляет около 2 % для альбуминов и 5 % для гамма-глобулинов.

Время жизни гликозилированного гемоглобина составляет 10-12 недель, фруктозамина – 2-3 недели. В норме концентрация в эритроцитах гликозилированного гемоглобина составляет менее 5,7%; при 5,7-9,0% - компенсированный диабет, при уровне более 9,0% диагностируют некомпенсированный диабет. Уровень фруктозамина до 285 считается нормальным, 285-450 мкмоль/л – латентный диабет, более 450 мкмоль/л – некомпенсированный диабет.

Вывод. Указать особенности проведённых реакций и объяснить, почему углеводы способны вступать в качественные и количественные реакции.

Вопросы и задания для самоконтроля:

1. На чем основана классификация углеводов?
2. Докажите некорректность термина «углеводы», приведите примеры.
3. Напишите в ациклической и циклической форме моносахариды: D-рибозу, D-глюкозу, D-маннозу, D-галактозу, D-фруктозу.
4. Напишите проекционные формы по Хеуорсу для α - и β -аномерных форм глюкозы, фруктозы, галактозы. В чём состоит основное различие между этими формами?
5. С помощью каких реакций можно доказать наличие в молекуле глюкозы альдегидной группы и пяти гидроксильных групп?
6. С помощью каких реакций можно осуществить следующие превращения:
 - а) сахароза \rightarrow глюкоза \rightarrow глюконовая кислота;
 - б) $\text{CO}_2 \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow (\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_5)_n \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$.
7. На чем основаны качественные реакции на углеводы? Каково их практическое значение?
8. На чем основаны методы количественного определения углеводов? Какие методы количественного определения углеводов наиболее достоверны?
9. Напишите уравнения реакций, с помощью которых можно различить глюкозу и фруктозу.
10. Какие моносахариды можно открыть реакцией Селиванова? Напишите уравнения реакций.
11. Какое явление называют реакцией серебряного зеркала? Напишите уравнение реакции.
12. Напишите уравнения реакций дегидратации рибозы и фруктозы в присутствии концентрированной соляной кислоты.

13. В каких условиях протекает гидролиз ди- и полисахаридов?
Напишите уравнения реакций гидролиза мальтозы и целлюлозы.

14. Почему дисахарид сахароза не может существовать в двух аномерных формах, тогда как дисахарид мальтоза может существовать в двух α - и β -аномерных формах. Изобразите проекционные формы Хеуорса для аномерных форм лактозы и сахарозы.

3.8 ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ЛИПИДОВ

К липидам относится большая группа довольно разнообразных соединений, нерастворимых в воде и хорошо растворимых в органических растворителях. Главными признаками липидов являются: биологическое происхождение, высокая степень гидрофобности и наличие в большинстве молекул алкильных радикалов. Основное количество липидов в клетках находится в виде эфиров различных спиртов (циклических и ациклических, одноатомных и многоатомных). Липиды гидрофобны. У одних классов преобладают гидрофобные свойства, они не растворяются в воде, находятся в аполярной фазе клетки и выполняют резервные функции. Другие липиды имеют выраженную гидрофильность, растворяются в воде и выполняют структурные функции. Биологическая роль липидов:

- непосредственный источник энергии для клетки,
- резервная форма энергии,
- структурный компонент биологических мембран животного происхождения,
- биологически активные вещества (гормоны, витамины),
- защитная функция (механическая защита, теплоизоляция),
- специфические функции (межклеточные контакты, передача сигнала в клетку).

По химическому составу выделяют три группы липидов:

- простые липиды – сложные эфиры спиртов и высших жирных кислот (нейтральные жиры, воска, стериды),
- сложные липиды, в состав которых помимо остатков жирных кислот и спиртов входят дополнительные компоненты, в зависимости от которых такие липиды подразделяют на фосфолипиды, гликолипиды и протеолипиды,

– предшественники и производные липидов. Эту группу соединений называют неомыляемыми липидами. Она включает свободные жирные кислоты, холестерин, желчные кислоты, жирорастворимые витамины, кетоновые тела.

Для **жирных кислот** тканей человека характерно:

- неразветвленная цепь углеродных атомов,
- длинная цепь углеродных атомов (C12 - C24, чаще C16, C18 и C24),
- наличие одной карбоксильной группы (монокарбоновые). Жирные кислоты могут быть предельными (насыщенными) и непредельными, как моно -, так и полиненасыщенными.

Особая роль отводится полиненасыщенным жирным кислотам: линолевой (ω_6 -жирной кислоте) и линоленовой (ω_3 -жирной кислоте), которые не синтезируются в организме человека и являются незаменимыми факторами питания. Суточная потребность в липидах составляет 0,7-1,0 г/кг массы.

Поступающие с пищей липиды животного (жиры) и растительного (масла) происхождения (99 % пищевых жиров – нейтральный жир) подвергаются гидролизу в пищеварительном канале с участием 4 типов липаз: язычной, желудочной, панкреатической и кишечной. Степень гидролиза зависит от степени эмульгирования жира и активности фермента. Всасываются липиды через мембрану энтероцита в лимфу или кровь в трёх формах: капелек эмульсии, мицелл или молекул ресинтезированного энтероцитом нейтрального жира. В процессах переваривания и всасывания липидов важная роль отводится желчным кислотам, синтезируемым в печени из холестерина. Транспортными формами липидов являются:

- хиломикроны,
- транспортные липопротеины различной плотности,

– свободные жирные кислоты под коллоидной защитой альбуминов.

Общее содержание липидов в крови колеблется в пределах 4,0-8,0 г/л. Повышение содержания общих липидов крови – гиперлипидемия, которая может быть, как наследственной, так и вторичной. Главный путь катаболизма жирных кислот в тканях – процесс β -окисления, он имеет место в матриксе митохондрий большинства клеток и выполняет как энергетическую (синтез восстановленных форм коферментов, водород с которых передаётся в дыхательную цепь, а энергия окисления идёт на окислительное фосфорилирование и синтез АТФ), так и пластическую функции (образование ацетил-КоА, который обеспечивает синтез холестерина, желчных кислот, кетонных тел, стероидных гормонов и других соединений). Нарушения обмена липидов приводят к тяжёлым заболеваниям, таким как гиперлипопротеинемии, атеросклероз и его осложнения, желчнокаменная болезнь.

Ацилглицерины (нейтральные жиры) – представляют собой сложные эфиры трёхатомного спирта глицерина и высших жирных кислот. Основная масса нейтральных жиров состоит из триацилглицеринов. У большинства живых организмов в составе ацилглицеринов преобладают жирные кислоты с чётным числом атомов. Наиболее распространённые жирные кислоты –стеариновая, пальмитиновая (насыщенные), олеиновая, линолевая, линоленовая (ненасыщенные). От соотношения входящих в состав ацилглицеринов насыщенных и ненасыщенных жирных кислот зависит ряд их свойств: температура плавления, йодное число, растворимость, способность образовывать эмульсии и другие свойства.

Работа 56. Акролеиновая проба

Цель работы. Ознакомиться с качественными реакциями на наличие в жирах остатка глицерина.

Оснащение работы:

Биоматериал	Приборы и оборудование	Реактивы
Жир	Штативы для пробирок; пробирки (10 мл); пипетки (1 - 2 мл); спиртовка.	Кислый серноокислый калий, сухой.

Принцип метода: Акролеиновой пробой открывается в жирах остаток глицерина, который при нагревании жира частично переходит в свободный глицерин. Глицерин теряет воду и образует ненасыщенный альдегид - акролеин, легко обнаруживаемый по специфическому раздражающему запаху. Акролеин может образовываться при пережёвывании пищи, и от его присутствия в значительной мере зависит резкий, удушливый запах кухонного чада. Акролеиновую пробу проводят, нагревая жир в присутствии бисульфита калия или натрия (в качестве водоотнимающего средства). Липиды, не содержащие глицерин (воск, жирные кислоты, стерины и т.д.), акролеиновой пробы не дают.

Пошаговое проведение работы:

1. Помещают в сухую пробирку 1-2 капли жира, добавляют щепотку сухого кислого серноокислого калия и нагревают до появления белых густых паров. Резкий раздражающий запах (осторожно!) говорит об образовании акролеина.

2. Проводят ту же реакцию с кусочком воска.

Образование акролеина не происходит, т.к. молекула воска не содержит остатка глицерина.

Растворение жиров

Цель работы. Ознакомиться с реакциями извлечения липидов из высушенных тканей органическими растворителями.

Оснащение работы:

Биоматериал	Приборы и оборудование	Реактивы
Жир	Штативы для пробирок; пробирки (10 мл); пипетки (1 - 2 мл); спиртовка.	Хлороформ; эфир; этиловый спирт; бензин (керосин).

Принцип метода: обычно липиды извлекают из высушенных тканей органическими растворителями. Для разделения липидов пользуются неодинаковой растворимостью их в различных растворителях: одни из них хорошо растворимы в эфире, но плохо в ацетоне (фосфолипиды), другие растворимы в бензоле, но нерастворимы в спирте (холестерол и др.).

Пошаговое проведение работы:

1. Помещают в несколько сухих пробирок по 3-4 капли исследуемого жира.
2. Добавляют в первую пробирку 2-3 мл бензина или керосина, во вторую - 2-3 мл хлороформа, в третью - 2-3 мл эфира, в четвертую - 2-3 мл этилового спирта.
3. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и наблюдают растворение жира во всех растворителях, кроме спирта.
4. Результаты опыта и его объяснение записывают.

Работа 57. Эмульгирование жиров

Цель работы. Ознакомиться с реакциями эмульгирования жиров

Оснащение работы:

Биоматериал	Приборы и оборудование	Реактивы
Жир	Штативы для пробирок; пробирки (10 мл); пипетки (1 - 2 мл); водяная баня	Вода дист., белок, 5% р-р; КОН, 1% р-р; сода, 2% р-р; мыло, 2% р-р желчь. Кислый сернокислый калий, сухой.

Принцип метода: в виду плохой растворимости в воде липиды образуют эмульсии с бифильными молекулами - белками, детергентами, желчью.

Пошаговое проведение работы:

1. В шесть пробирок помещают по 3 капли исследуемого раствора и по 2-3 мл дистил. воды. Необходимо следить, чтобы количество воды и жира везде было приблизительно одинаковым.

2. Добавляют в первую пробирку несколько капель раствора белка, во вторую - несколько капель раствора КОН, в третью - несколько капель раствора соды, в четвертую - несколько капель раствора мыла, в пятую - желчи, в шестую - не добавляют ничего (она будет служить контролем).

3. Помещают на короткое время все шесть пробирок в горячую водяную баню для расплавления жира, если жир жидкий, то нагревание в бане излишне. Взбалтывают содержимое всех пробирок.

4. Ставят их по порядку в штатив и наблюдают образование в первых пяти пробирках относительно устойчивой эмульсии, а в шестой - расслоение неустойчивой эмульсии на жир и воду.

Работа 58. Гидролиз жира (омыление)

Биоматериал	Приборы и оборудование	Реактивы
Растительное масло	Штативы для пробирок; пробирки (10 мл); пипетки (1 - 2 мл); водяная баня	КОН, 40% р-р.

Пошаговое проведение работы:

1. В пробирку наливают около 2 мл растительного масла и добавляют равный объем 40% раствора едкого калия. Пробирку закрывают пробкой, в которую вставлена стеклянная трубочка (холодильник), помещают в

кипящую водяную баню и держат там до образования однородного раствора мыла.

2. Результат опыта и уравнение реакции записывают.

3. В пробирку наливают примерно 8-10 мл воды и взбалтывают.

Полученный раствор используют для определения составных частей жира.

Открытие в гидролизате составных частей жира

А. Открытие жирных кислот

Биоматериал	Приборы и оборудование	Реактивы
Гидролизат	Штативы для пробирок; пробирки (10 мл); пипетки (1 - 2 мл); водяная баня	конц. H ₂ SO ₄ .

Пошаговое проведение работы:

1. В пробирку наливают часть полученного в четвёртом опыте гидролизата и добавляют несколько капель концентрированной серной кислоты.

2. Пробирку опускают в кипящую водяную баню до образования на поверхности жидкости жирного слоя.

Б. Открытие глицерина.

Биоматериал	Приборы и оборудование	Реактивы
Гидролизат	Штативы для пробирок; пробирки (10 мл); пипетки (1 - 2 мл); водяная баня	NaOH, 10% р-р.

Пошаговое проведение работы:

1. В пробирку наливают примерно 2 мл гидролизата, добавляют 8-10 капель 10% раствора едкого натра и несколько капель 2% раствора сернокислой меди.

2. Появляется слабо-синее окрашивание, вследствие образования глицерата меди. Результаты обеих реакций записывают.

Открытие ненасыщенных жирных кислот в жире

Биоматериал	Приборы и оборудование	Реактивы
Гидролизат растительное масло	Штативы для пробирок; пробирки (10 мл); пипетки (1 - 2 мл); водяная баня	Бромная вода

Пошаговое проведение работы:

1. В 2 пробирки наливают по 1 мл бромной воды. В первую пробирку добавляют несколько капель растительного масла и тщательно встряхивают; наблюдают обесцвечивание бромной воды. Вторая пробирка служит контролем.

2. Результаты опыта и уравнение реакции записывают.

Работа 59. Качественное открытие липопротеинов

Цель работы: научиться открывать в сыворотке крови суммарно липопротеины.

Принцип метода: липиды со спиртовым раствором судана образуют характерное розовое окрашивание.

Пошаговое выполнение работы:

1. Каплю сыворотки нанести на фильтровальную бумагу, высушить при температуре не выше 90°C.

2. Поместить бумагу в чашку Петри, залить раствором судана и оставить на 60 минут.

3. После этого достать бумагу, дать стечь реактиву. Спиртовым раствором в чистой чашке Петри промыть бумагу. На месте нанесения сыворотки крови заметно розовое пятно окрашенных липопротеинов и хиломикронов.

4. Данные оформить в виде протокола.

Работа 60. Определение свободных (неэтерифицированных) жирных кислот в сыворотке крови (НЭЖК)

Цель работы: научиться определять количество свободных жирных кислот, знать клинико-диагностическое значение теста.

Принцип метода основан на экстрагировании липидов из сыворотки крови изопропиловым спиртом с последующим титрованием свободных жирных кислот 0,01 н. КОН в присутствии фенолфталеина (3-4 капли).

Пошаговое проведение работы:

1. Отмерить 10 капель сыворотки крови, внести 2 мл изопропилового спирта и тщательно перемешать в течение 2-х минут.

2. Добавить 1-2 капли фенолфталеина и оттитровать смесь из бюретки 0,01 н. раствором КОН в до устойчивого слабо-розового цвета.

3. Расчёт:

$$0,56 \text{ мг} \cdot A \cdot 2 \cdot 1000,$$

где, 0,56 – грамм эквивалент КОН, А – количество мл щелочи, пошедшее на титрование НЭЖК, 2 – коэффициент для пересчёта на 1 мл сыворотки, 1000 – переход к 1 литру.

4. Оформить в виде протокола. В норме в сыворотке крови содержится 20-50 мг % = 0,2-0,5 г/л неэтерифицированных жирных кислот.

Диагностическое значение: это транспортная форма жира, направляемого из жировых депо к работающим органам. Она является основным показателем активности процесса мобилизации жира. При голодании количество НЭЖК резко возрастает за счёт мобилизации. Уровень НЭЖК у детей выше.

СТЕРОЛЫ, СТЕРИДЫ

В основе структуры стероидов лежит циклопентанпергидрофенантрен (четыре конденсированных кольца). Наиболее распространённый и биологически важный стерин животных тканей – циклический спирт холестерин. Он входит в состав плазматических мембран, а также мембран митохондрий и в состав эндоплазматического ретикулума, но в значительно меньшем количестве. Холестерин также содержится в крови и желчи. В растениях обнаружены другие стерины (фитостерины) и стероидные гликозиды (сапонины). К стеридам относятся также такие биологически активные вещества, как гормоны надпочечников (кортизол, кортикостерон, альдостерон), половые гормоны (андрогены и эстрогены), желчные кислоты, витамин D. Под влиянием концентрированной серной кислоты и уксусного ангидрида холестерин превращается в углеводороды с суммарной формулой $C_{54}H_{86}$ и $C_{54}H_{88}$ (бихолестадиены), которые с серной кислотой образуют диеновые кислоты: с двумя молекулами серной кислоты – продукт красного цвета (реакция Сальковского), с одной молекулой серной кислоты - продукт зелёного цвета (реакция Либермана-Бурхарда).

Работа 61. Качественные реакции на холестерин

Реакция Сальковского

Биоматериал	Приборы и оборудование	Реактивы
Холестерин, 1% р-р в хлороформе	Штативы для пробирок; пробирки (10 мл); пипетки (1 - 2 мл);	Уксусный ангидрид; серная кислота, конц.

Принцип метода: метод основан на дегидратации молекулы холестерина под действием концентрированной серной кислоты с образованием холестерилена, имеющего красную окраску.

Пошаговое проведение работы:

1. В сухую пробирку наливают 10 капель 1% хлороформного р-ра холестерина и добавляют равный объем концентрированной серной кислоты (осторожно по стенке пробирки).

2. При лёгком встряхивании на границе 2-х слоёв жидкости образуется оранжевое кольцо, которое при стоянии переходит в красное. Нижний слой серной кислоты приобретает зелёную флуоресценцию.

Работа 62. Реакция Либермана – Бурхарда

Биоматериал	Приборы и оборудование	Реактивы
Холестерин, 1% р-р в хлороформе	Штативы для пробирок; пробирки (10 мл); пипетки (1 - 2 мл); водяная баня	Уксусный ангидрид; серная кислота, конц

Пошаговое проведение работы:

1. В сухую пробирку наливают 10 капель 1% хлороформного раствора холестерина, добавляют 3-5 капель уксусного ангидрида и 1-2 капли концентрированной серной кислоты.

2. Содержимое пробирки осторожно встряхивают и помещают в баню при температуре 40⁰С на 1-2 минуты или оставляют при комнатной температуре на 5-10 минут. В присутствии холестерина вначале появляется красное окрашивание, которое затем переходит в фиолетовое, синее и зелёное. При незначительном содержании холестерина в растворе сразу появляется зелёное окрашивание.

Количественное определение холестерина

Биоматериал	Приборы и оборудование	Реактивы
-------------	------------------------	----------

Сыворотка крови	Штативы для пробирок; пробирки (10 мл); пипетки (1 - 2 мл); ФЭК	реактив Либермана-Бурхарда; стандартный раствор холестерина, 100мг/100мл; хлороформа.
-----------------	---	---

Принцип метода: в основе количественного определения лежит цветная реакция Либермана-Бурхарда.

Пошаговое проведение работы:

1. В пробирку (опытная проба) прилить 1,5 мл реактива Либермана-Бурхарда, затем осторожно по стенке пробирки добавить 0,2 мл сыворотки крови и 0,3 мл хлороформа.

2. Содержимое пробирки энергично встряхнуть. Пробу оставить на 20 мин для развития окраски.

3. В другую пробирку (контрольная проба) прилить 1,5 мл реактива Либермана-Бурхарда и 0,5 мл хлороформа.

4. Интенсивность зелёного окрашивания в опытной пробе измерить на ФЭКе против контрольной пробы при длине волны $\lambda = 630-690$ нм (красный светофильтр) в кювете 0,5 см.

5. Построение калибровочного графика. В пробирки 1-5 внести стандартный раствор холестерина в количествах, указанных в таблице, затем в соответствующих количествах добавить хлороформ и реактив Либермана-Бурхарда.

6. Содержимое пробирок встряхнуть. Через 20 минут измерить экстинкции на ФЭКе против контрольной пробы.

№ пробирки	Количество стандартного раствора холестерина, мл	Количество хлороформа, мл	Количество реактива Либермана-Бурхарда, мл	Количество холестерина в пробе, мг
1	0,1	0,4	1,5	0,1
2	0,2	0,3	1,5	0,2

3	0,3	0,2	1,5	0,3
4	0,4	0,1	1,5	0,4
5	0,5	-	1,5	0,5

Работа 63. Кинетика действия липазы

Цель работы: научиться количественно характеризовать активность липазы в динамике по степени гидролиза нейтрального жира.

Принцип метода: об активности липазы можно судить по количеству свободных жирных кислот, выделившихся в единицу времени при гидролизе нейтрального жира. Количество жирных кислот определяется титрованием 0,05 н. раствором гидроксида натрия. Скорость ферментативной реакции при прочих равных условиях зависит от концентрации фермента и субстрата. С увеличением времени воздействия фермента на субстрат глубина гидролиза возрастает, свидетельством чего является нарастание количества продуктов реакции в реакционной смеси.

Пошаговое проведение работы:

1. В 6 пробирок налить по 1 мл молока и по 2 капли раствора липазы (строго соблюдать количество).
2. В 1-ю пробирку добавить 1 каплю 1% раствора фенолфталеина и содержимое немедленно оттитровать 0,05 н. раствором NaOH до устойчивого розового цвета.
3. Остальные 5 пробирок оставить при комнатной температуре и через каждые 10 минут поочерёдно оттитровать 0,05 н. раствором NaOH в присутствии фенолфталеина.
4. Изобразить графически процесс гидролиза жиров под действием фермента липазы, откладывая на оси абсцисс время взаимодействия фермента и субстрата, на оси ординат – количество щелочи, пошедшее на каждое титрование.
5. Сделать заключение по обнаруженной закономерности.

Работа 64. Определение общих липидов крови турбидиметрическим методом

Цель работы: освоить метод количественного определения общих липидов и сыворотке крови. Знать клинко-диагностическое значение определения общих липидов сыворотки крови.

Принцип метода основан на измерении оптической плотности жировой эмульсии, образующейся при взаимодействии серной кислоты с экстрактом липидов сыворотки крови.

Пошаговое проведение работы:

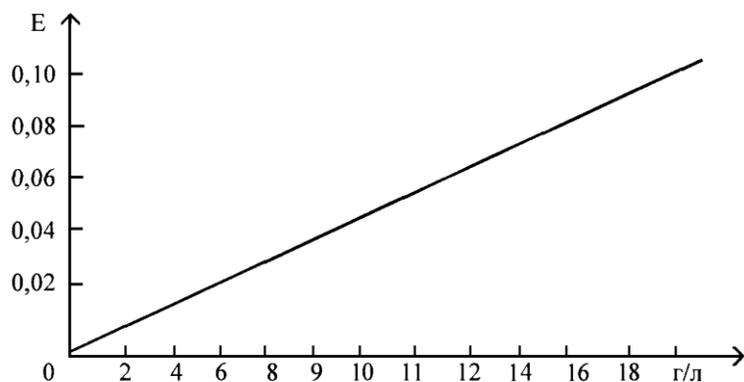
1. В пробирку налить 2 капли (0,1 мл) сыворотки крови, добавить 2 мл смеси Бюра (смесь этанола и эфира в соотношении 3:1), встряхнуть и поместить пробирку в водяную баню (с t не выше 80°C), довести содержимое до кипения.

2. После охлаждения под струёй холодной воды содержимое отфильтровать через бумажный фильтр, смоченный водой, в чистую пробирку.

3. К общему объёму фильтрата добавить 5 мл 1% раствора серной кислоты и поставить в кипящую баню на 1 мин.

4. Охладить и через 30 мин. определить оптическую плотность раствора на ФЭК-М при красном светофильтре с рабочей длиной кюветы 5 мл против дистиллированной воды.

Определить содержание общих липидов в данной сыворотке, пользуясь калибровочной кривой.



Данные оформить в виде протокола.

Диагностическое значение: Общие липиды сыворотки крови представлены нейтральными жирами, фосфолипидами, холестерином, свободными жирными кислотами, липопротеинами различной плотности. В норме содержание общих липидов составляет 4,0-8,0 г/л.

Работа 65. Определение содержания β -липопротеинов сыворотки крови (по Бурштейну)

Цель работы: научиться количественно определять β -липопротеины (ЛПНП), знать клинико-диагностическое значение метода.

Принцип метода основан на осаждении ЛПНП (β -липопротеины) гепарином в присутствии ионов Ca^{2+} , сопровождающимся помутнением раствора. По степени помутнения раствора можно судить о количественном содержании липопротеинов.

Пошаговое проведение работы:

1. В две пробирки (опытная и контрольная) внести по 2 мл 0,025 М CaCl_2 добавить по 0,2 мл (4 капли) сыворотки и тщательно перемешать.
2. В опытную пробирку добавить 1 каплю 1% гепарина, перемешать и строго через 4 минуты измерить экстинкцию опытной и контрольной пробирки при красном светофильтре и толщине кювет 5 мм.

3. Рассчитать содержание β -липопротеинов в сыворотке по формуле:

$$(D_2 - D_1) \cdot 10 = \text{г/л } \beta\text{-липопротеинов,}$$

где, D_2 – экстинкция опытной пробы, D_1 – экстинкция контрольной пробы, 10 – эмпирический коэффициент.

4. Сделать заключение о содержании β -липопротеинов.

Диагностическое значение: в сыворотке крови здоровых людей в зависимости от возраста и пола уровень β - липопротеинов колеблется в пределах 3,0-4,5 г/л. Уровень липопротеинов растёт при атеросклерозе, ожирении, хронических поражениях печени, при механической желтухе, диабете, гипотиреозе, при алиментарной гиперлипемии. Уменьшение β - липопротеинов имеет место при плазмоцитоме.

ФОСФОЛИПИДЫ

Основная масса фосфолипидов представлена производными фосфатидной кислоты – фосфатидами (в основном, фосфатидилхолины (лецитины), фосфатидилэтаноламины (кефалины) и фосфатидилсерины). Кроме того, в тканях присутствуют фосфатидилинозиты, сфингофосфатиды и дифосфатидилглицерины, в частности, кардиолипин, который обладает иммуномодуляторными свойствами. Фосфолипиды содержатся преимущественно в биологических мембранах, являясь их главным липидным компонентом.

Работа 66. Получение фосфатидилхолинов из яичного желтка

Реактивы: 1) яичный желток; 2) CH_3COOH ; 3) ацетон; 4) NaOH , 10% раствор; 5) CaCl_2 , насыщенный р-р; 6) HCl , 10% р-р; 7) кислый серноокислый К, сухой; 8) Na_2CO_3 , сухой; 9) KNO_3 , сухой; 10) HNO_3 , 10% р-р; 11) молибденовый реактив; 12) H_2O дист.

Пошаговое проведение работы:

1. Помещают в стаканчик приблизительно $1/5$ часть одного куриного желтка и добавляют при перемешивании около 10-15 мл горячего спирта.

2. При охлаждении смесь фильтруют в сухую пробирку. Если в фильтрате появилась муть, то фильтрование повторяют до получения совершенно прозрачного раствора.

Осаждение ацетоном

В пробирку наливают 2-3 мл ацетона и по каплям приливают немного полученного фильтрата. Наблюдается появление мути в ацетоне, что указывает на выпадение холинфосфатидов, которые в ацетоне не растворимы.

Эмульгирование

К 2-3 мл спиртового раствора добавляют по каплям дистиллированную воду. Наблюдают образование устойчивой эмульсии фосфатидилхолинов.

Осаждение фосфатидилхолинов хлористым кадмием

При добавлении хлористого кадмия к спиртовому раствору фосфатидилхолинов последние выпадают в осадок, т.е. образуется соединение их с хлористым кадмием, в котором на 3 частицы фосфатидилхолинов приходится 4 части хлористого кадмия. Это соединение слабо растворимое.

Пошаговое проведение работы:

1. В сухую пробирку наливают 5 капель спиртового раствора фосфатидилхолинов и добавляют 1-2 капли насыщенного раствора хлористого кадмия.

2. Выпадает осадок.

Гидролиз фосфатидилхолинов

1. К оставшемуся спиртовому раствору фосфатидилхолинов добавляют 3-5 мл 10% раствора едкого натра и подвергают кипячению в течении 5-10 минут. Происходит гидролитический распад фосфатидилхолинов с отщепление холина, жирных кислот и глицеринфосфатной кислоты.

2. При нагревании ощущается запах селёдочного рассола или посинение лакмусовой бумажки, характерные для триметиламина, образующегося из холина.

3. В растворе устанавливают наличие жирных кислот, глицерина, фосфорной кислоты.

Работа 67. Количественное определение общего холестерина в сыворотке крови

Цель работы: научиться количественно определять содержание общего холестерина в сыворотке. Знать клинико-диагностическое значение метода.

А. Количественное определение общего холестерина сыворотки крови по методу Илька

Принцип метода основан на способности холестерина в присутствии уксусного альдегида и смеси уксусной и серной кислот образовывать окрашенные продукты; интенсивность развивающегося зелёного окрашивания пропорциональна количеству общего холестерина сыворотки.

Пошаговое проведение работы:

1. В чистую, сухую (обязательно) пробирку внести из бюретки 2 мл реакционной смеси (работа проводится под вытяжным шкафом) и осторожно по стенке добавить 2 капли сыворотки крови.

2. Осторожно, под вытяжным шкафом встряхнуть содержимое и добавить ещё 3-4 капли концентрированной серной кислоты.

3. Встряхнуть до растворения осадка белка. Пробирку перенести в штатив и поместить в термостат при 37°C на 20 минут для развития окраски.

4. Колориметрировать на ФЭКе при красном светофильтре и толщине кюветы 5 мм против реакционной смеси.

5. Содержание холестерина в пробе определяется по таблице пересчёта.

6. Записать результаты опыта (протокол оформить произвольно), сделать заключение о содержании холестерина в данном образце сыворотки крови.

Показание ФЭК	Содержание холестерина, ммоль/л	Показание ФЭК	Содержание холестерина, ммоль/л
0,03	1,3	0,12	4,9
0,04	1,7	0,13	5,3
0,05	12,1	0,14	5,7
0,06	2,5	0,15	6,1
0,07	2,9	0,16	6,5
0,08	3,3	0,18	7,3
0,09	3,7	0,19	7,7
0,10	4,1	0,20	8,1
0,11	4,5		

Б. Количественное определение общего холестерина в сыворотке крови по методу Маркоса и Товарека

Принцип метода: холестерин в соединениях с уксусным ангидридом, серной кислотой и сульфосалициловой кислотой принимает изумрудную окраску.

Пошаговое выполнение работы:

1. В сухую пробирку внести 4 капли сыворотки крови, добавить 4 капли ледяной уксусной кислоты, затем 20 капель сульфосалициловой кислоты, 3 мл уксусного ангидрида (из бюретки).

2. Не размешивая смесь, оставить пробирку при комнатной температуре на 10 минут для охлаждения.

3. Через 10 минут к смеси добавить 8 капель концентрированной серной кислоты и перемешать содержимое пробирки.

4. Поставить пробу в темноту (можно в термостат) при температуре 20°C на 30 минут для развития окраски.

5. Параллельно ставится контрольная проба (две на группу). Порядок выполнения тот же, но вместо 4 капель сыворотки крови внести 4 капли дистиллированной воды.

6. Через 30 минут проколориметрировать на ФЭКе опытную пробирку против контрольной при красном светофильтре и толщине кюветы 0,5 см.

Расчёт: количество общего холестерина рассчитывается по формуле:

$$C = E \cdot 667 / 38,7$$

где, E – экстинкция раствора, 667 – эмпирический коэффициент, 38,7 – пересчёт на ммоль/л.

7. Протокол опыта оформить произвольно, сделать заключение о содержании общего холестерина в сыворотке крови.

Работа 68. Определение холестерина в ЛПВП и расчёт индекса атерогенности по методу Е.А. Бородина

Цель работы: уметь определять количество холестерина в липопротеинах высокой плотности (этерифицированного) и рассчитывать индекс атерогенности.

Принцип метода основан на способности раствора хлорида магния на 4% растворе фосфорновольфрамовой кислоты осаждать ЛПНП и ЛПОНП (атерогенные). По разности в содержании общего холестерина и этерифицированного (ЛПВП), определяется содержание свободного холестерина (в составе ЛПОНП и ЛПНП) и рассчитывается индекс атерогенности.

Пошаговое выполнение работы:

1. Внести в центрифужную пробирку 1 мл сыворотки крови, добавить 2 капли 0,5 М $MgCl_2$, приготовленного на 4% растворе фосфорновольфрамовой кислоты, и оставить на 30 минут для осаждения фракций липопротеинов.

2. Отцентрифугировать содержимое пробирки в течение 10 минут при 3000 об/мин.

3. Слить надосадочную жидкость.

4. В надосадочной жидкости определить содержание холестерина по любому методу определения общего холестерина крови. (Количество надосадочной жидкости увеличить в 1,5 раза с учётом разбавления сыворотки крови). Это холестерин ЛПВП, т.е. эфирносвязанный, неатерогенный.

5. Разница между общим холестерином ($XC_{общий}$) крови и холестерином ЛПВП и есть свободный холестерин крови (ЛПОНП + ЛПНП).

6. Расчёт индекса атерогенности

$$C = XC_{общ} - XC_{ЛПВП} / XC_{ЛПВП}$$

Данные оформить в виде протокола.

Диагностическое значение метода: Индекс атерогенности используется как тест вероятности развития атеросклероза. Эта величина в норме у взрослых составляет 2,0-3,5. При атеросклерозе и его осложнениях

она всегда превышает 4,0, в тяжёлых случаях патологии этот показатель достигает величин 5,0 и даже 6,0.

Работа 69. Обнаружение кетоновых тел

Цель работы: научиться качественными реакциями обнаруживать присутствие в моче кетоновых тел. Уметь объяснить причину их появления, использовать тест как прогностический показатель течения заболевания.

Принцип работы: метод основан на способности кетоновых тел давать окрашенные соединения с различными реагентами.

А. Проба Легалья на ацетон

Пошаговое выполнение работы:

1. В пробирку внести около 2 мл патологической мочи, добавить 3-4 капли 10% раствора гидроксида натрия и 3 капли нитропрусида натрия. Появляется красно-бурое окрашивание.

2. Подкислить смесь концентрированной уксусной кислотой. Окрашивание становится ярко-красным.

3. Для сравнения проделать качественную реакцию с нормальной мочой, не содержащей ацетона. При подкислении окрашивание становится жёлтым.

Б. Проба Герхарда на ацетоуксусную кислоту

Принцип метода: ацетоуксусная кислота с хлоридом железа (III) образует энولات железа красного цвета.

Пошаговое выполнение работы:

1. В пробирку к 5 мл патологической мочи добавить по каплям 10% р-р хлорида железа (III). Образуется жёлто-белый осадок феррифосфатов. Раствор добавлять до тех пор, пока осадок прекратит образовываться. В присутствии ацетоуксусной кислоты развивается красное окрашивание.

2. Осадок отфильтровывают через воронку с фильтром, смоченным водой. Фильтрат получается прозрачным и окрашенным в цвет красного вина. Фильтрат мочи, не содержащий ацетоуксусную кислоту, окрашивается в красно-жёлтый цвет.

3. Для сравнения проделать реакцию с нормальной мочой. Данные опыта записать в виде протокола произвольной формы.

Диагностическое значение: Кетоновые тела (ацетон, β -гидроксимасляная и ацетоуксусная кислоты) являются нормальными метаболитами липидного обмена. Они образуются в печени и отправляются током крови в мышцы, где подвергаются дальнейшему окислению. Содержание их в крови в норме колеблется до 30 мг/л. При сахарном диабете, голодании содержание кетоновых тел резко возрастает (кетонемия), как следствие, они появляются в моче (кетонурия).

Склонность к кетозу у детей обусловлена:

1. Сверхобразованием кетоновых тел в печени, поскольку большой процент энергозатрат ребёнок первых лет жизни покрывает за счёт окисления липидов, образуется большое количество активной уксусной кислоты, идущей на синтез кетоновых тел.

2. Окисление кетоновых тел в мышцах ребёнка ослаблено, поскольку преобладают анаэробные процессы, активность ферментов аэробного окисления снижена.

3. Часты транзиторные кетонемии и кетонурии, детский организм легче переносит эти отклонения, он более резистентен к кетозу.

Липидный состав диеты ребёнка. Основным компонентом диеты должны быть жиры молока, они высокоэмульгированы, легче перевариваются и полней усваиваются организмом ребёнка. У детей значительно выше потребность в эссенциальных $\omega 3$ - и $\omega 6$ -жирных кислот,

поскольку у них интенсивней процессы биосинтеза как клеток, так и эйкозаноидов.

Особенности переваривания и всасывания липидов в постнатальном периоде

1. Потребность в липидах у детей выше, чем у взрослых, поскольку больший процент затрат энергии покрывается липидами:

до 4 лет – 3,5-4,0 г/кг массы тела

4-11 лет – 2,0-2,5 г/кг

взрослый – 1,0-1,5 г/кг

2. Главный пищевой жир ребёнка первого года жизни – жир молока, он эмульгирован, в его составе много короткоцепочечных жирных кислот, он легко расщепляется в желудке лингвальной липазой.

3. У ребёнка интенсивно желудочное переваривание липидов, где гидролизуется до 30% пищевых жиров язычной липазой, которая очень активна у грудных детей.

4. Всасывание короткоцепочечных жирных кислот, высвобождающихся при гидролизе триацилглицеринов молока, осуществляется стенкой желудка в воротную вену.

Бурая жировая ткань – зона метаболизма, где окисление липидов сопровождается выделением больших количеств тепла. У новорождённых в бурой жировой ткани метаболизм очень интенсивен. Эта ткань хорошо кровоснабжается, содержит много митохондрий, богатых ферментами тканевого дыхания, активно поглощает кислород и интенсивно окисляет глюкозу и жирные кислоты. Активность АТФ-синтетазы в этой ткани очень низкая, поэтому окисление и фосфорилирование в ней не являются сопряжёнными процессами. В бурой жировой ткани имеет место только субстратное фосфорилирование (гликолитическое, а также тиокиназная

реакция ЦТК). Основное количество высвобождаемой в ходе окисления энергии превращается в тепло. В митохондриях бурой жировой ткани присутствует белок термогенин, который осуществляет транспорт протонов через внутреннюю мембрану митохондрий по градиенту концентрации и рассеивает протонный градиент. Синтез АТФ при этом не происходит. Бурая жировая ткань выполняет терморегуляторную функцию. Процесс протекает особенно активно при угрозе нарушения теплового баланса.

Работа 70. Определение жирных кислот

1. Исследуемый раствор разбавляют небольшим количеством воды и подкисляют 10% р-ром HCl, выпадает осадок свободных жирных кислот. Осадок отфильтровывают, фильтрат нейтрализуют 10% р-ром щелочи (на лакмус) и выпаривают на водяной бане досуха.

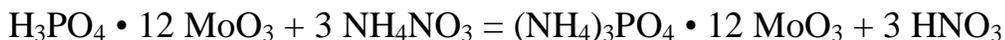
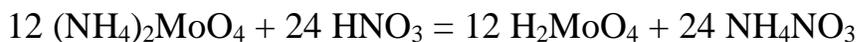
Обнаружение глицерина

В части сухого остатка определяют присутствие глицерина по акролеиновой пробе.

Обнаружение фосфора

Ход работы: Часть сухого остатка переносят в фарфоровый тигель и тщательно смешивают с двух-, трёхкратным количеством смеси, состоящей из 2-х частей карбоната натрия и 1-ой части нитрата калия. Тигель прикрывают крышкой и осторожно нагревают. Реакция идёт бурно, иногда она сопровождается небольшой вспышкой. Сплав осторожно прокалывают до полного окисления. После охлаждения тигеля серовато-бурую золу растворяют в 10% р-ре азотной кислоты (добавлять по каплям, растирая палочкой), и в полученном растворе обнаруживают фосфорную кислоту с помощью молибдата аммония или магнезиальной смеси, для чего к 2 мл молибденового реактива прибавляют небольшими порциями испытуемый

раствор. Смесь слегка нагревают. Образуется жёлто-зелёный осадок фосфомолибдата аммония:



Результаты опытов и объяснение записывают.

Вопросы и задания для самоконтроля:

1. Биологическое значение и классификация липидов. Напишите формулы и охарактеризуйте простые липиды: ацилглицерины, стериды, воска.
2. Ацилглицерины, их строение, физико-химические свойства и роль в организме.
3. Строение, физико-химические свойства жирных кислот.
4. Строение фосфолипидов и их свойства.
5. Сфинголипиды. Их строение и свойства.
6. Стероиды и стериды. Наиболее важные биологически активные стериды (гормоны, желчные кислоты, витамин D).
7. Дайте общую характеристику сложных липидов. Какова их биологическая роль.
8. Привести формулу триацилглицерина, в состав которого входят олеиновая, стеариновая и пальмитиновая кислоты. Дать рациональное название.

9. Напишите структурную формулу цереброзидов. Дать рациональное название.

10. Напишите формулы, отражающие общее строение сфингомиелинов и ганглиозидов.

11. Напишите структурную формулу сфингозина и дайте его рациональное название.

3.9 ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛОКА

Грудное молоко, вырабатываемое молочными железами, является лучшей пищей, обеспечивающей всестороннее правильное развитие грудного ребёнка. Оно содержит все необходимые питательные вещества – белки (1%), жиры (4%), углеводы (7%), витамины, соли, и микроэлементы (1%), воду (87%) в таких количествах и соотношениях, которые наиболее полно отвечают потребностям быстро растущего организма ребёнка. Кроме того, сырое женское молоко содержит ферменты, которые при попадании с молоком в пищеварительный тракт дополняют действие ферментов пищеварительных соков ребёнка. В нем содержатся гормоны, которые принимают участие в обменных процессах и, наконец, иммунные глобулины, имеющие значение для защитных функций организма ребёнка.

Молоко матери – жидкость, защищающая ребёнка от инфекций. Оно содержит антивирусные и антипаразитарные факторы, лейкоциты, ряд антиинфекционных элементов, а также антитела против возбудителей инфекций, ранее перенесённых матерью. Поэтому, молоко даже во время болезни матери будет лучшей иммунной защитой для новорождённого, благодаря иммуноглобулину IgA, который, в отличие от других иммуноглобулинов, выделяется только в молоко.

Цель изучения раздела: Уметь применять знания об основных компонентах грудного молока для характеристики полноценного развития ребёнка в период лактации.

Работа 71. Определение белка.

Пошаговое выполнение работы:

1. В пробирку, содержащую 4,5 мл смеси Фольча, приливают 0,05 мл молока, тщательно встряхивают в течении 1 минуты, центрифугируют при скорости 3000 об/мин в течении 5 минут и супернатант сливают.

2. К осадку добавляют 1 мл биуретового реактива, тщательно перемешивают и оставляют на 30 минут при комнатной температуре для развития реакции.

3. Пробы фотометрируют против биуретового реактива на фотоэлектроколориметре при зелёном светофильтре.

При нормальных условиях концентрация общего белка в грудном молоке колеблется в пределах:

3 день лактации - 21,5 г/л

4 день лактации - 17,1 г/л

5 день лактации - 14,4 г/л

6 день лактации - 12,8 г/л

7 день лактации - 12,8 г/л

Работа 72. Определение жира.

Пошаговое выполнение работы:

1. В пробирку с 4 мл концентрированной серной кислоты по Савалю вносят 0,01 мл молока, тщательно перемешивают, ставят в кипящую водяную баню на 20 минут, после чего охлаждают водопроводной водой.

2. 0,2 мл гидролизата переносят в другую сухую обезжиренную пробирку, добавляют 2 мл фосфованилинового реактива и оставляют на 1 час.

3. Пробу колориметрируют при зелёном светофильтре против контрольной пробы, которую обрабатывают так же, как и опытную, только вместо 0,01 мл молока берут 0,01 мл дистиллированной воды.

Работа 73. Определение углеводов.

Пошаговое выполнение работы:

1. 0,01 мл молока приливают в пробирку с 1 мл дистиллированной воды и тщательно перемешивают.

2. Из полученного разведения молока отбирают 0,2 мл переносят в другую пробирку, добавляют 2,3 мл антронового реактива, перемешивают, помещают в кипящую водяную баню на 15 минут и затем охлаждают водопроводной водой.

3. Пробу колориметрируют при красном светофильтре против контрольной пробы, которую готовят смешиванием 0,2 мл дистиллированной воды с 2,3 мл антронового реактива с последующим нагреванием и охлаждением, как и в опытной пробе.

4. Для расчёта количества белка, жира и углеводов в исследуемой пробе молока используют калибровочные графики, построенные на основании определения по выше изложенной методике указанных веществ в эталонных растворах.

Работа 74. Определение удельного веса молока.

Пошаговое выполнение работы:

1. Определение производится с помощью ареометра.

2. Для анализа молоко наливают в специальный цилиндр и по уровню погружения ареометра определяют удельный вес молока.

Удельный вес коровьего молока – 1,028; женского молока – 1,026

Работа 75. Определение титрационной кислотности молока.

Принцип метода: Титрационной кислотностью молока называют количество 0,1 Н раствора едкого натра необходимое для титрования по фенолфталеину 100 мл молока.

Пошаговое выполнение работы:

1. В две конические колбы отмеривают пипеткой по 10 мл молока.
2. Добавляют по две - три капли фенолфталеина.
3. Содержимое одной колбы титруют из микробюретки 0,1 Н раствором едкого натра до слабо – розовой окраски.
4. Для того чтобы заметить появление этой окраски, цвет титруемой жидкости сравнивают с цветом молока в другой колбе.
5. Титрационную кислотность вычисляют по пропорции:

$$\begin{array}{l} a - 10 \text{ мл} \\ x - 100 \text{ мл} \end{array}$$

где: а – количество раствора едкого натра, пошедшего на титрование, мл, 10 – объем молока взятый для анализа, мл, х – титрационная кислотность.

Кислотность женского молока – 5-9; коровьего – 17-18;

Контрольные вопросы:

1. Что такое лактация?
2. От каких факторов зависит лактация?
3. Когда вырабатывается молозива?
4. Отличие в содержании белка в молоке млекопитающих.
5. Функция иммуноглобулинов молока.
6. Жиры молока.
7. Биологическая ценность липидов молока.
8. Функция углеводов молока.
9. Минеральные вещества в молоке.

IV. ОБМЕН ВЕЩЕСТВ

4.1 ИССЛЕДОВАНИЕ ОБМЕНА И ФУНКЦИИ АМИНОКИСЛОТ

Цель изучения раздела: Уметь применять знания об основных путях превращений аминокислот для характеристики функционального состояния органов и тканей, для распознавания причин метаболических нарушений. Изучить основные пути дезинтеграции белка и роль в этом процессе пищеварительных соков. Освоить методику анализа желудочного сока. Научиться определять в крови основные метаболиты обмена аминокислот. Уметь использовать полученные данные с целью диагностики заболеваний. Уметь применять знания основ молекулярной генетики для объяснения механизмов клеточной дифференцировки, онтогенеза, процессов адаптации для решения вопросов диагностики наследственных болезней.

Основные вопросы раздела:

1. Пищевые белки, переваривание их в желудочно-кишечном тракте в норме и при патологии.
2. Анализ желудочного сока, расчёт всех видов кислотности.
3. Основные пути превращения аминокислот в тканях. Значение биохимической диагностики нарушений метаболизма аминокислот.
4. Конечные продукты белкового обмена. Обнаружение их в биологических жидкостях в норме и при патологии.
5. Основные направления биохимической диагностики наследственных болезней.

Главной структурной единицей белковой молекулы являются аминокислоты, поэтому метаболизм аминокислот характеризует состояние обмена белков. Для обмена белков характерно:

- неспособность организма собирать углеродные скелеты ряда аминокислот (незаменимые аминокислоты), они должны поступать с пищей в составе полноценных белков;

- сохранение постоянного баланса аминокислот в тканях при значительном колебании содержания их в пище;

- постоянное обновление белков, скорость которого определяется локализацией молекулы, функцией, строением, возрастом организма (динамическое состояние);

- чрезвычайная разветвлённость метаболических путей превращения аминокислот в тканях.

Белки – незаменимый фактор питания, потребность, составляет 1,0-1,5 г/кг массы у взрослого человека и зависит от возраста, интенсивности метаболических процессов в тканях и качества пищевого белка (содержания в нем незаменимых аминокислот, способности гидролизоваться в желудочно-кишечном тракте). В переваривании белков участвует две группы протеолитических пищеварительных ферментов:

- эндопептидазы – ферменты, рвущие внутренние пептидные связи,
- экзопептидазы, отщепляющие N-концевые и C-концевые аминокислотные остатки и завершающие протеолиз.

Для протеолитических ферментов характерно:

- выделяются железами пищеварительной системы в неактивном состоянии (в форме проферментов),

– имеют единый механизм активации – частичный протеолиз – отщепление одного или нескольких пептидов от молекулы с образованием активного фермента,

– наличие субстратной специфичности,

– независимость действия.

Конечными продуктами гидролитического расщепления белков являются свободные аминокислоты, подвергающиеся активному транспорту через мембрану энтероцита в кровь. Катаболизм аминокислот – внутриклеточный процесс, в котором выделяют два варианта:

1. Общие пути катаболизма, в результате которых все аминокислоты могут первично терять α -аминогруппу (дезаминирование, трансаминирование) или α -карбоксильную группу (декарбоксилирование).

2. Индивидуальные пути катаболизма, при которых имеют место первичные превращения аминокислоты по радикалу (транسمетилирование, де- и транссульфирование, гидроксилирование и др.).

Конечными продуктами катаболизма аминокислот являются аммиак, вода и углекислый газ.

Аммиак – токсичное соединение, особенно для центральной нервной системы. Это судорожный яд, требующий постоянного обезвреживания. Механизм токсического действия аммиака сводится к следующему:

1. на обезвреживание аммиака расходуется α -кетоглутаровая кислота, это приводит к выключению её из цикла трикарбоновых кислот, блокаде ЦТК и развитию гипоэнергетического состояния.

2. повышенная концентрация аммиака в крови (гипераммониемия) приводит к нарушению кислотно-основного состояния, развивается алкалоз.

3. нарушается синтез медиаторов, нарушается проведение нервных импульсов, страдает нервная система.

4. изменяется концентрация в крови катионов натрия и калия, нарушается электролитный баланс.

Поскольку аммиак очень токсичен, его необходимо повсеместно обезвреживать с образованием транспортных форм (глутамата, глутамина, амидированных карбоксильных групп белков плазмы крови), которые затем направляются в печень или в почки, где осуществляется окончательное обезвреживание аммиака с образованием менее токсичных форм его выведения – мочевины, аммонийных солей. При катаболизме сложных белков распад простетических групп приводит к образованию других азотсодержащих конечных продуктов (желчных пигментов, мочевой кислоты). Высокая степень разветвлённости метаболических путей превращения аминокислот вовлекает в процесс множество высокоспецифичных ферментных систем, генетические дефекты которых обуславливают появление большого количества наследственных нарушений аминокислотного обмена, проявляющихся тяжёлыми наследственными болезнями.

Работа 76. Определение кислотности желудочного сока в одной порции (по Михаэлису)

Цель работы: научиться титровать желудочный сок, рассчитывать все виды кислотности, уметь делать заключение о функциональном состоянии желудка по анализу сока. В желудочном соке в норме присутствует свободная соляная кислота, которая создаёт кислую среду в желудке, активирует пепсиноген и создаёт Рн-оптимум для действия пепсина, денатурирует пищевые белки, регулирует работу привратника и обладает бактерицидным действием. Часть соляной кислоты связывается с белками и продуктами их гидролиза, это связанная HCl, со свободной она образует общую HCl. В

желудочном соке присутствуют органические кислоты и кислые фосфаты – это кислореагирующие продукты. Они вместе с общей соляной кислотой дают общую кислотность желудочного сока, которая определяется методом титрования 0,1н гидроксидом натрия. При титровании всех видов кислотности желудочного сока в одной пробе используется два индикатора: фенолфталеин (одноцветный индикатор с зоной перехода 8,0-10,2), и парадиметиламиноазобензол (двухцветный с зоной перехода 2,9-4,0).

Пошаговое выполнение работы:

1. В стеклянный стаканчик или колбочку отмерить мерной пробиркой 5 мл желудочного сока, добавить 1-2 капли диметиламиноазобензола и 2 капли фенолфталеина. Если в желудочном соке есть свободная соляная кислота, он приобретает красно-розовый цвет.

2. Оттитровать из бюретки 0,1 н. гидроксидом натрия до оранжевого цвета (I пункт титрования), записать результат и, не подливая в бюретку щёлочь, продолжить титрование до лимонно-жёлтого цвета (II пункт, считая от нуля), записать результат и продолжить титрование, не добавляя щёлочь, до красного цвета (III пункт).

3. Первый пункт – оттитрована свободная соляная кислота, второй пункт – нужен для расчёта, третий пункт – оттитрована общая кислотность. Таким образом титруется свободная соляная кислота и общая кислотность, остальные виды находятся методом расчёта.

4. Кислотность рассчитывается в ммоль/л желудочного сока.

4.1. Свободная HCl:

$$X = I_{II} \cdot 1000 \cdot 0,1 / 5$$

где, X – искомая кислотность в ммоль/л, I п. (также: II п. и III п.) – объём щелочи, ушедший на титрование в мл, 0,1 – молярность NaOH, 1000 – пересчёт на л, 5 – объём титруемой пробы в мл.

6. Общая кислотность:

$$X = \text{III п} \cdot 1000 \cdot 0,1 / 5$$

7. Общая HCl:

$$X = (\text{II п} + \text{III п}) / 2 \cdot 1000 \cdot 0,1 / 5$$

8. Связанная HCl:

это разность между общей и свободной соляной кислотой:

$$X = \text{HCl}_{\text{общ.}} - \text{HCl}_{\text{своб.}}$$

9. Прочие кислореагирующие продукты:

разность между общей кислотностью и общей соляной кислотой:

$$X = \text{Общ.кисл.} - \text{HCl}_{\text{общ.}}$$

Пример расчёта:

на титрование 5 мл желудочного сока израсходовано щелочи:

I пункт – 2,0 мл 0,1 н. NaOH

II пункт – 2,5 мл 0,1 н. NaOH

III пункт – 2,7 мл 0,1 н. NaOH

10. Свободная HCl:

$$X = I п \cdot 1000 \cdot 0,1 / 5$$
$$2,0 \text{ мл} \cdot 1000 \cdot 0,1 \text{ ммоль/л} / 5 \text{ мл} = 40 \text{ ммоль/л}$$

11. Общая кислотность:

$$X = \text{III п} \cdot 1000 \cdot 0,1 / 5$$
$$2,7 \text{ мл} \cdot 1000 \cdot 0,1 \text{ ммоль/л} / 5 \text{ мл} = 54 \text{ ммоль/л}$$

12. Общая HCl:

$$X = (\text{II п} + \text{III п}) / 2 \cdot 1000 \cdot 0,1 / 5$$
$$(2,5 \text{ мл} + 2,7 \text{ мл}) / 2 \cdot 1000 \cdot 0,1 / 5 = 52 \text{ ммоль/л}$$

13. Связанная HCl:

$$X = HCl_{общ.} - HCl_{своб.}$$
$$52 - 40 = 12 \text{ ммоль/л}$$

14. Прочие кислореагирующие продукты:

$$X = \text{Общ.кисл.} - HCl_{общ.}$$
$$54 - 52 = 2 \text{ ммоль/л}$$

15. Оттитровать 3 желудочных сока, данные занести в таблицу:

Сок	мл NaOH, пошедшего на титрование		
	I пункт	II пункт	III пункт
№1			
№2			
№3			

Рассчитать все виды кислотности и занести в таблицу:

Сок	Кислотность				
	общая	свободная HCl	общая HCl	HCl связанная	прочие
№1					
№2					
№3					

6. Сделать заключение о характере секреции. Свободную соляную кислоту принято рассчитывать и в г/%, при этом следует исходить из того, что 1 мл 0,1 н. гидроксида натрия эквивалентен 1 мл 0,1 н. соляной кислоты; 1 мл 0,1 н. HCl содержит 0,00365 г.

Диагностическое значение: Общая кислотность желудочного сока может как повышаться (гиперацидное состояние), так и снижаться (гипоацидное), вплоть до исчезновения (анацидное состояние). Гиперацидное состояние вызывается в основном избытком свободной соляной кислоты, т.е.

возникает гиперхлоргидрия. Снижение НСІ в желудочном соке — это гипохлоргидрия, отсутствие – ахлоргидрия. Изменение кислотности желудочного сока имеет место при язвенной болезни, гастритах, при раке, злокачественном малокровии.

Работа 77. Количественное определение пепсина в желудочном соке (по Пятницкому Н. П.)

Цель работы: научиться определять активность пепсина в различных образцах желудочного сока по молоко свёртывающему действию с диагностической целью. Пепсин, протеолитический фермент, способен гидролизировать белки при рН 1,5-2,5, а при рН 5,0 – створаживать казеиноген молока за счёт превращения его в казеин (в основе превращения лежит также гидролиз пептидных связей). За единицу активности фермента принимают такое его количество, которое створаживает 5 мл молочно-ацетатной смеси рН 5,0 (смесь равных объёмов молока и 1 н. ацетатного буфера рН 5,0) при 25°С за 60 секунд. 100 единиц Пятницкого соответствует 1 мг фермента. В норме желудочный сок содержит 20-40 ед./мл (0,2-0,4 мг/мл, или 0,2-0,4 г/л) пепсина.

Пошаговое выполнение работы:

1. В чистую сухую пробирку микропипеткой отмерить 0,1 мл одного из желудочных соков (2 капли).
2. В другую пробирку отмерить 5 мл молочно-ацетатной смеси рН 5,0 и на водяной бане (+25 °С) подогреть.
3. Затем влить молочно-ацетатную смесь (МАС) в пробирку с желудочным соком и одновременно включить секундомер.
4. Перемешивая пробирку с реакционной смесью, следить за появлением хлопьев казеина на стенках пробирки. В момент их появления выключить секундомер, записать время створаживания.

5. Рассчитать активность пепсина. Если при активности 1 ед./мл створаживание должно идти за 60 секунд, то искомая активность равна:

$$X = 60 \cdot 10 / t$$

где: 60 – стандартное время створаживания, сек; t – полученное время створаживания (в сек.), 10 – расчёт на 1 мл желудочного сока.

6. Определить активность 2-3 соков, рассчитать в единицах и в мг/мл. При поражении желудочно-кишечного тракта активность пепсина резко меняется.

Работа 78. Патологические составные части желудочного сока

Цель работы: научиться качественно обнаруживать в желудочном соке кровь и молочную кислоту, знать диагностическое значение их появления в желудочном соке.

А. Открытие молочной кислоты.

Принцип метода. Оно основано на реакции Уфельмана (способности молочной кислоты давать жёлто-зелёное окрашивание с раствором фенола в присутствии хлорида железа (III)).

Пошаговое выполнение работы:

1. В пробирку внести 20 капель 1% раствора фенола, добавить 2 капли 1 % раствора хлорида железа (III), раствор окрашивается в фиолетовый цвет фенолята железа $(C_6H_5O)_3Fe$.

2. Добавить по каплям желудочный сок, содержащий молочную кислоту. При наличии последней фиолетовая окраска переходит в жёлто-зелёную за счёт образования лактата железа. Молочная кислота, как правило, обнаруживается при ахлоргидрии, когда за счёт микробов в желудке сбразиваются полисахаридные комплексы муцина.

В. Открытие крови бензидиновой пробой.

Принцип метода. Реакция основана на окислении бензидина атомарным кислородом, высвобождающимся из перекиси водорода под действием пероксидазы крови.

Пошаговое выполнение работы:

1. В пробирку налить 20 капель желудочного сока с кровью, добавить 20 капель уксуснокислого раствора бензидина и 3-4 капли перекиси водорода.

2. Развивается сине-зелёное окрашивание за счёт появления парахинондиимида. Данные оформить в виде протокола произвольной формы.

Возрастная характеристика процессов переваривания и всасывания белков

1. Потребность в белке у детей выше, чем у взрослых, поскольку белок расходуется в этот период жизни в основном на пластические нужды, обусловленные интенсивным ростом и процессами самообновления тканей. Так, суточная потребность в зависимости от возраста:

Новорождённый – 2,2 г/кг массы тела

Грудной – 2,9 г/кг

Дошкольник – 2,0 г/кг

Школьник – 1,5-2,0 г/кг

Взрослый – 1,0-1,5 г/кг

2. У ребёнка выше потребность в незаменимых, особенно остродефицитных, аминокислотах (Мет, Лей, Три).

3. Дети более чувствительны к голоданию, особенно белковому. При недостатке белка в пище страдает синтез антител, появляется склонность к инфекционным заболеваниям.

4. В желудочном соке новорождённых детей имеется ранняя форма пепсина (реннин), фермент створаживает молоко, задерживает казеиноген в желудке, что улучшает его переваривание.

5. Основное переваривание белков идёт в тонкой кишке, но, чем моложе ребёнок, тем слабей этот процесс. Активность протеиназ у ребёнка низкая, с возрастом она растёт.

6. Вследствие высокой проницаемости мембраны энтероцита и низкой активности протеолитических ферментов возможно всасывание нерасщеплённых белковых молекул, это вызывает сенсбилизацию организма, приводит к непереносимости пищевых продуктов.

Высокая степень всасываемости белков:

Новорождённый – 84 %

Грудной – 78 %

Дошкольник – 73 %

Взрослый < 70 %

Работа 79. Определение свободного аминного азота в сыворотке крови

Цель работы: научиться определять свободный аминный азот в сыворотке крови, освоить диагностическое значение данного биохимического теста. Свободный аминный азот сыворотки крови представляет собой азот свободных аминокислот, содержащихся в сыворотке крови (в основном Глу и Асп).

Принцип метода количественного определения основан на способности нингидрина взаимодействовать с продуктами деградации аминокислот и давать сложный комплекс сине-фиолетового цвета. Интенсивность развивающегося окрашивания пропорциональна количеству свободных аминокислот.

Определение проводится в 3 этапа:

1. Осаждение белков, при этом сыворотка освобождается от α -аминного азота белковых молекул.

2. Реакция свободных аминокислот с нингидрином.

3. Электрофотокolorиметрия и расчет.

Пошаговое выполнение работы:

1. В центрифужную пробирку внести 10 капель сыворотки крови и добавить 10 капель 0,04 н. уксусной кислоты (сдвиг рН сыворотки к изоэлектрической точке).

2. Пробирку поместить в кипящую водяную баню на 5 минут для осаждения белков, охладить.

3. К содержимому пробирки добавить 1 мл дистиллированной воды, тщательно перемешать и профильтровать в чистую пробирку с меткой на 5 мл через бумажный фильтр, смоченный несколькими каплями дистиллированной воды.

4. Пробирку дважды промыть дистиллированной водой по 1 мл и промывные воды отфильтровать в ту же пробирку.

5. К полученному безбелковому фильтрату добавить 10 капель 1% водного раствора нингидрина, перемешать содержимое пробирки и поставить на 20 минут в кипящую баню для развития окраски.

6. Пробирку охладить, добавить до метки дистиллированной воды и через 5 минут колориметрировать на ФЭКе против дистиллированной воды при зеленом светофильтре и рабочей длине кюветы 5 мм.

7. По калибровочной таблице, построенной по стандартному раствору аланина, найти содержание свободных аминокислот в мкг в пробе и в мг/л. В норме содержание свободных аминокислот по этой методике составляет 20-43 мг/л.

Градуировочная таблица для определения аминного азота (ФЭК, зеленый светофильтр, кювета шириной 5 мм)

Диагностическое значение теста: Увеличение содержания свободных аминокислот в крови имеет место при деструктивных состояниях: печеночной коме, острой желтой атрофии печени, при отравлениях (фосфором, фенилгидразином, CCl_4 , хлороформом), при квашиоркоре, тяжелых ожогах, шоке, истощающих поносах, после кровотечений. Уменьшение уровня аминокислот характерно для почечных поражений, для гиперпродукции инсулина, гормона роста, андрогенов.

Работу оформить в виде таблицы:

№	Показания ФЭК	Содержание аминного азота в пробе, мг/л
1		
2		

Вопросы и задания для самоконтроля:

1. Значение белков, азотистый баланс, биологическая ценность белков, динамическое состояние белков тела
2. переваривание белков в желудке, кишечнике, всасывание продуктов распада белков.
3. Нормальное, патологический состав желудочного сока и значение желудочного сока при переваривании белков
4. Превращение аминокислот под действием микрофлоры кишечника.

По каким показателям различаются патологический и нормальный желудочный сок.

4.2 ИССЛЕДОВАНИЕ ОБМЕНА СЛОЖНЫХ БЕЛКОВ (ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИИ ПЕЧЕНИ)

Структурными компонентами информационных нуклеиновых кислот – ДНК, РНК – являются нуклеотиды пуринового и пиримидинового ряда. Биосинтез мононуклеотидов является жизненно важным процессом, поскольку он обеспечивает образование компонентов молекул нуклеиновых кислот, а также нуклеотидных коферментов. Свободные нуклеотиды, которые не используются для синтеза нуклеиновых кислот, подвергаются расщеплению с образованием конечных продуктов обмена. Определение количественного содержания таких продуктов (например, мочевой кислоты) имеет клинко-диагностическое значение при лечении ряда заболеваний (подагра и т.п.).

Работа 80. Выделение дезоксирибонуклеопротеинов из селезёнки

Принцип метода: Дезоксирибонуклеопротеины (ДНП) выделяют из тканей, богатых клеточными ядрами, например, из селезёнки и др. ДНП хорошо растворимы в растворах солей средней концентрации (например, в 1 М р-ре хлорида натрия) и осаждаются в виде нитей при разведении раствора до 0,15 М дистиллированной водой.

Пошаговое проведение работы:

1. В ступке растирают в течении 1 минуты 2 г селезёнки с равным количеством кварцевого песка.
2. Добавляют 5 мл охлаждённого 2 М раствора хлорида натрия, содержащего 0,04 % трёхзамещённого цитрата натрия, тщательно растирая.
3. Далее добавляют порциями 50 мл охлаждённого 1 М раствора хлорида натрия и продолжают тщательно растирать в течение 15 минут.
4. Полученную массу равномерно распределяют по центрифужным пробиркам.

5. После уравнивания пробирок центрифугируют 15 мин при 3000 об/мин.

6. Надосадочную жидкость сливают в мерный цилиндр, измеряют её объем и затем медленно тонкой струёй вливают в шестикратный объем дистиллированной воды.

7. Наматывают нити ДНП на деревянную палочку.

8. Нити ДНП с палочки переносят в пробирку с 2 мл 0,4% раствора едкого натрия.

9. С полученным раствором проводят две реакции:

Биуретовая реакция

Ход работы: К 5 каплям исследуемой жидкости прибавляют 5 капель 10% р-ра едкого натра, 2 капли 1% р-ра сульфата меди и всё перемешивают. Содержимое пробирки приобретает фиолетовый цвет. Нельзя добавлять избыток сульфата меди, так как синий осадок гидрата окиси меди маскирует характерное фиолетовое окрашивание биуретового комплекса белка.

Реакция на дезоксирибозу ДНК с дифениламином

Ход работы: К 15-20 каплям 1% раствора дифениламина (растворенного в смеси уксусной и серной кислот), прибавляют равный объем исследуемого раствора. Пробирку со смесью закрывают алюминиевой фольгой и помещают в кипящую водяную баню на 15 минут. При этом ДНК гидролизует, освободившаяся дезоксирибоза реагирует с дифениламином и даёт синее окрашивание.

Работа 81. Количественное определение мочевой кислоты в сыворотке крови

Принцип метода: Мочевая кислота восстанавливает фосфорновольфрамвокислый реактив, в результате чего образуются более

низкие окислы вольфрама синего цвета, интенсивность окраски которых пропорциональна количеству мочевой кислоты.

Пошаговое проведение работы:

1. Для исследования берут две центрифужные пробирки:

Содержимое пробирок, мл	Исследуемая проба	Холостая проба
Вода дистиллированная	4,0	4,5
Сыворотка крови	0,5	-
Кислота серная	0,25	0,25
Вольфрамат натрия	0,25	0,25

2. Перемешать, выдержать 10 минут при комнатной температуре.

Центрифугировать 10 минут при 3000 об/мин. Отобрать центрифугат:

Центрифугат	2,0	2,0
Раствор карбоната натрия	1,0	1,0
Фосфорновольфрамовый реактив	0,6	0,6

3. Перемешать, выдержать 30 минут при комнатной температуре. При длине волны 650 (620-700 нм) в кюветах с толщиной слоя 10 мм измерить оптическую плотность исследуемой пробы ($E_{\text{иссл.}}$) против холостой пробы.

Расчёт результатов проводится по формуле:

$$C = E_{\text{иссл.}} \cdot 300 / E_{\text{ст.}} \cdot 1000$$

где, C - концентрация мочевой кислоты в сыворотке крови (ммоль/л); $E_{\text{иссл.}}$ - экстинкция опытной пробы против холостой; $E_{\text{ст.}}$ - экстинкция стандартной пробы против холостой; 300 - концентрация мочевой кислоты в стандартном растворе (мкмоль/л); 1000 – коэффициент перерасчёта в ммоль/л.

Нормальное содержание мочевой кислоты в сыворотке крови: у мужчин – 0,18 - 0,54 ммоль/л; у женщин – 0,15-0,45 ммоль/л.

Работа 82. Количественное определение мочевой кислоты в моче.

Пошаговое проведение работы:

1. Перед началом исследования мочу развести в десять раз (1 мл мочи + 9 мл H₂O)

2. Провести действия согласно таблице:

Отмерить в пробирку, мл	Опыт	Контроль
Дистиллированная вода	4,0	4,5
Разбавленная моча (1:9)	0,5	-
Кислота серная	0,25	0,25
Вольфрамат натрия	0,25	0,25

3. Перемешать, выдержать 10 минут при комнатной температуре, отфильтровать, отобрать необходимое количество фильтрата

Фильтрат	2	2
Карбонат натрия	1	1
Фосфорновольфрамовый реактив	0,6	0,6

4. Перемешать, выдержать 30 минут при комнатной температуре, измерить оптическую плотность опытной пробы (E_{оп.}) против контрольной при 650 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

5. Расчёт концентрации мочевой кислоты проводят по формуле:

$$C = E_{\text{оп.}} \cdot 300 \cdot 10 \cdot X / E_{\text{ст.}} \cdot 1000$$

где: C – содержание мочевой кислоты в моче, ммоль/сут; E_{оп.} – экстинкция опытной пробы; E_{ст.} – экстинкция стандартной пробы; 300 – содержание мочевой кислоты в стандартном растворе, мкмоль/л; 1000 – коэффициент перерасчёта в ммоль/л; 10 – разведение мочи; X – суточный диурез: 1,5 л – мужчины, 1,2 л – женщины.

Нормальное содержание мочевой кислоты в моче составляет: 1,48-4,43 ммоль/сут.

У вегетарианцев этот показатель $<2,48$ ммоль/сут. При употреблении пищи, содержащей большое количество пуринов, концентрация мочевой кислоты может возрасти до $5,9$ ммоль/сут.

Клинико-диагностическое значение: Содержание мочевой кислоты в крови зависит от пола, количества пуринов в пище, а также от интенсивности обмена нуклеопротеинов в организме. Увеличение концентрации мочевой кислоты в плазме крови выше $0,54$ ммоль/л - гиперурикемия.

Гиперурикемию диагностируют при подагре, которая сопровождается отложением солей мочевой кислоты (уратов натрия) в хрящах, слизистой сумке суставов. При этом содержание мочевой кислоты в крови может быть повышено, а с мочой выделяться её меньше, чем в норме. Гиперурикемия наблюдается также у пациентов с нефритом, почечной недостаточностью и др. Гиперурикемия и подагра развиваются у пациентов с генетическими нарушениями активности ферментов синтеза пуриновых нуклеотидов (фосфорибозилпирофосфат-амидотрансферазы, гипоксантингуанин-фосфорибозил-трансферазы), у больных с синдромом Леш-Нихана.

Гипоурикемия наблюдается при генетическом дефекте ксантиноксидазы, что сопровождается накоплением ксантинов в крови пациентов и выведением их в большой концентрации с мочой (ксантинурия).

Вопросы и задания для самоконтроля:

1. Нуклеопротеины: структура, биологические функции, классификация, локализация в клетке.
2. Молекулярная организация ядерного хроматина эукариотов: нуклеосомная организация; гистоны и негистоновые белки.

3. Нуклеиновые кислоты. Сравнительная характеристика ДНК и различных типов РНК: особенности строения, функции, локализация в клетке, уровни структурной организации.

4. Нуклеотиды и нуклеозиды: строение, биологическая роль. Минорные азотистые основания.

5. Производные мононуклеотидов (нуклеозидтрифосфаты, циклические мононуклеотиды, НАД⁺, НАДФ⁺, ФАД, ФМН): структура и функции в клетке.

6. Биохимический состав, структура и функции биологических мембран.

7. Роль липидов в построении биологических мембран. Жидкокристаллическая мозаичная модель биологических мембран. Асимметрия мембран.

8. Общие представления о биосинтезе пуриновых нуклеотидов: схема реакций синтеза ИМФ, образование АМФ и ГМФ; механизм регуляции.

9. Биосинтез пиримидиновых нуклеотидов: схема реакций, регуляция синтеза.

10. Биосинтез дезоксирибонуклеотидов. Образование dТМФ; ингибиторы биосинтеза dТМФ как противоопухолевые средства.

11. Катаболизм пуриновых нуклеотидов. Нарушения обмена пуриновых нуклеотидов. Подагра.

12. Схема катаболизма пиримидиновых нуклеотидов. Конечные продукты распада пиримидиновых нуклеотидов.

4.3 ХРОМОПРОТЕИНЫ. ОБМЕН ГЕМОГЛОБИНА И ЕГО НАРУШЕНИЕ. МЕТАБОЛИЗМ ПОРФИРИНОВ

Определение гемоглобина крови и его производных, прежде всего, билирубина, имеет большое клинико-диагностическое значение. Билирубин - желчный пигмент, производный гемоглобина - образуется в печени и селезёнке. Определение прямого и непрямого билирубина является диагностическим маркёром различных типов желтух. Наследственные нарушения синтеза порфиринов являются причиной тяжёлых патологических состояний - порфирий.

Работа 83. Определение общего, прямого и непрямого билирубина

Принцип метода: Диазореактив даёт с прямым билирубином (билирубина моно- и диглюкурониды) розовую окраску. Интенсивность окраски раствора (азобилирубин) пропорциональна концентрации прямого билирубина и может быть определена фотоколориметрическим методом. Непрямой билирубин (комплекс билирубина с альбуминами плазмы крови) можно перевести в растворимое состояние добавлением к плазме кофеинового реактива, который повышает растворимость этого пигмента, и определить с помощью диазореакции.

Пошаговое проведение работы:

1. В две пробирки внести по 0,5 мл плазмы крови, разбавленной в 2 раза изотоническим раствором NaCl.
2. В первую пробирку (определение прямого билирубина) прибавить 1,75 мл 0,9 % NaCl и 0,25 мл диазореактива Эрлиха.
3. Во вторую пробирку прибавить 1,75 мл кофеинового реактива и 0,25 мл диазореактива Эрлиха (определение общего билирубина).
4. Обе пробирки встряхнуть.

5. Для определения прямого билирубина необходимо фотометрировать через пять минут после добавления диазосмеси, а для определения общего билирубина - через 20 минут.

6. Измерение оптической плотности каждой пробы проводят по сравнению с контрольной пробой, которую выдаёт старший лаборант. Фотометрируют в кюветах 5 мм при длине волны 540-560 нм (светло-зелёный светофильтр).

7. Содержание общего и прямого билирубина определяют по графику, умножив результаты на 2. Разность между общим и прямым билирубином – это непрямой билирубин плазмы крови.

В норме: содержимое общего билирубина 3,5-20,5 мкмоль/л;

непрямого билирубина <12 мкмоль/л,

прямого билирубина <7 мкмоль/л.

Клинико-диагностическое значение. Определение общего билирубина и его фракций имеет большое клинико-диагностическое значение. Установлено, что желтуха появляется тогда, когда уровень билирубина в крови превышает 27-34 мкмоль/л.

Рост содержимого свободного билирубина в крови наблюдается при надпечёночных желтухах, к которым относятся гемолитические анемии различного происхождения, а также функциональные гипербилирубинемии: постгепатитная гипербилирубинемия, болезнь Жильбера, физиологическая желтуха новорождённых, семейная негемолитическая желтуха новорождённых (синдром Криглера-Найяра). Свободный билирубин в моче не появляется. Содержание уробилина в моче и стеркобилина в кале при гемолитических анемиях повышено, при других формах надпечёночных желтух в норме или снижено.

У больных с печёночными желтухами в крови повышен уровень непрямого билирубина и прямого билирубина. Печёночные желтухи - следствие паренхиматозных повреждений – это и синдром Дубина-Джонсона, и синдром Ротора. В моче появляется прямой билирубин. Количество стеркобилина в кале снижено. При подпечёночных желтухах (механическая желтуха) в крови возрастает содержание как связанного, так и свободного (в меньшей степени) билирубина, билирубин появляется в моче, в кале сниженное содержание стеркобилина.

Широко известно понятие "функциональные гипербилирубинемии". Это несколько типов желтух, которые отличаются доброкачественностью течения и протекают без выраженного поражения паренхимы печени, без признаков вне- или внутripечёночной закупорки желчных протоков, а также без повышенного гемолиза. В зависимости от того, на каком этапе нарушается обмен билирубина, выделяют две основные формы гипербилирубинемий, которые характеризуются:

- 1) повышением содержания в плазме крови свободного билирубина (I тип);
- 2) повышением в плазме крови преимущественно связанного билирубина (II тип).

К первому типу гипербилирубинемий относится болезнь Жильбера, а также постгепатитная гипербилирубинемия, физиологическая желтуха новорождённых и семейная негемолитическая желтуха новорождённых Криглера-Найяра. Эти заболевания протекают без повышенного гемолиза, со сниженным содержанием стеркобилина и уробилина. Считают, что при этом виде гипербилирубинемий ухудшение конъюгации билирубина в гепатоците связано со снижением активности УДФ-глюкуронилтрансферазы. Увеличение связанного и частично свободного билирубина наблюдается при

желтухах, которые возникают в результате поражения паренхимы печени факторами инфекционного и токсичного характера. Кроме нарушения экскреции связанного билирубина в желчные капилляры (вследствие чего он попадает непосредственно в кровь), наблюдается ослабление конъюгации свободного билирубина и поступление его в печёночную клетку. Это приводит также и к повышению уровня свободного билирубина в плазме крови таких больных.

Для второго типа гипербилирубинемий, к которым относятся болезнь Дубина-Джонсона и синдром Ротора, характерен рост свободного билирубина. Развитие подобных желтух вызвано нарушением транспорта связанного билирубина печёночной клеткой.

Качественные реакции на желчные пигменты в моче (реакция Гмелина)

Принцип метода: Желчные пигменты окисляются концентрированной нитратной кислотой с образованием окрашенных в разные цвета продуктов окисления: биливердина (зелёного цвета), билицианина (синего цвета), холелетина (жёлтого цвета) и др. Пробу Гмелина можно проводить в пробирке или на фильтровальной бумаге. Высокая чувствительность реакции даёт возможность проявить билирубин в разведении 1:80 000.

Пошаговое проведение работы:

1. В пробирку наливают 1-2 мл концентрированной нитратной кислоты, которая содержит следы нитритной.
2. Осторожно по стенке накладывают равный объем исследуемой мочи. При наличии в моче желчных пигментов на границе жидкостей появляются цветные кольца.

3. Характерное появление зелёного, синего, фиолетового, красного и жёлтого колец в указанной последовательности отвечает разным степеням окисления пигмента.

Работа 84. Определение уробилина в моче по реакции Богомолва

Принцип метода: Уробилин при взаимодействии с сульфатом меди (II) образует соединение розово-красного цвета.

Пошаговое проведение работы:

1. Перед проведением пробы к моче прибавляется 1-2 капли раствора йода для окисления уробилиногеновых тел в уробилиновые.

2. К 10 мл мочи прибавляют 2 мл насыщенного раствора CuSO_4 .

3. Если появляется помутнение вследствие образования $\text{Cu}(\text{OH})_2$, прибавляют 1-2 капли хлоридной кислоты до получения прозрачного раствора.

4. Через 5 минут доливают 2-3 мл хлороформа. Пробу взбалтывают и дают отстояться. При наличии уробилиновых тел слой хлороформа окрашивается в розово-красный цвет.

Клинико-диагностическое значение. К пигментам, которые образуются в кишечнике из билирубина, относятся уробилиноген и стеркобилиноген (уробилиногеновые тела) и их окисленные формы: уробилин и стеркобилин соответственно (уробилиновые тела). Повышенное выделение уробилиногеновых (уробилиновых) тел с мочой называется уробилинурией.

Уробилинурия (с обнаружением, главным образом, уробилиногена) встречается при гепатоцеллюлярных заболеваниях печени (гепатит, цирроз, отравления и др.), сердечно-сосудистой патологии, которая сопровождается застойным повреждением печени. Уробилиноген, который возвращается из

кишечника по портальной вене, не претерпевает обычных для него преобразований из-за функциональной недостаточности печени и выводится с мочой.

Работа 85. Унифицированный метод по диазореакции в присутствии акселератора (Метод Ендрассика—Клеггорна—Грофа)

Билирубин – продукт ферментативного окисления гемоглобина (конечный продукт распада гема), образующийся в результате естественного распада эритроцитов в клетках ретикуло-эндотелиальной системы, он относится к группе желчных пигментов. Билирубин – токсичное вещество, т.к. молекула билирубина является гидрофобной и может проникать через гематоэнцефалический барьер в клетки головного мозга. В печени происходит обезвреживание билирубина путём образования его конъюгатов с глюкуроновой кислотой. Синтезированный в гепатоцитах билирубин-диглюкуронид экскретируется с желчью в ЖКТ, где высвобождается из конъюгатов, восстанавливается до уробилиногена, затем превращается в стеркобилиноген, в форме которого и выводится из организма. В крови присутствуют 2 фракции билирубина: *неконъюгированный* (составляет 75% от общего количества в крови, гидрофобный, связан с альбумином, не обезвреженный в печени, «непрямой», не выводится с мочой) и *конъюгированный* (составляет 25% от общего количества, гидрофильный, малотоксичен, связан с глюкуроновой кислотой, «прямой», при увеличении концентрации в крови появляется в моче), которые в сумме составляют *общий* билирубин.

Принцип метода. В основе количественного определения билирубина лежит реакция азосочетания билирубина с диазосмесью Эрлиха, в результате которой появляется малиново-красное окрашивание за счёт образовавшегося

азобилирубина. В сильно кислой среде под воздействием HCl разрывается тетрапирроловая связь билирубина и образуются два дипиррола, которые диазотируются диазобензосульфоновой кислотой с образованием азобилирубина. Концентрация последнего определяется фотоколориметрически. Билирубиндиглюкуронид реагирует с диазосмесью непосредственно, тогда как свободный билирубин неустойчив в растворе в сильно кислой среде, при которой происходит реакция азосочетания, и требует присутствия стабилизатора, роль которого выполняют кофеин, либо спирт, мочеви́на, ацетат, бензоат натрия.

Перечень реактивов:

1. Кофеин.
2. Натрия бензоат.
3. Натрия ацетат 3-водный (ч.д.а. или х.ч.)

Кофеиновый реактив: 5 г кофеина, 7,5 г бензоата натрия, 12,5 г ацетата натрия растворяют в 90 мл воды, нагревают до 50 - 60°C, хорошо перемешивают. После охлаждения доводят водой до 1000 мл. Раствор стабилен в течение 2 нед.

4. Натрия хлорид (ч.д.а. или х.ч.), 154 ммоль/л (изотонический раствор): 0,9 г хлорида натрия помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят до метки водой.

5. HCl концентрированная (ч.д.а. или х.ч.)
6. Сульфаниловая кислота (ч.д.а.)

Диазореактив Эрлиха I (раствор сульфаниловой кислоты 0,5%): 5 г сульфаниловой кислоты растворяют при нагревании в 300—400 мл воды, прибавляют 15 мл концентрированной HCl. Если сульфаниловая кислота полностью не растворяется, колбу помещают в тёплую воду и помешивают.

Только после растворения и охлаждения раствор доливают водой до 1 л. Реактив стабилен при хранении в посуде из тёмного стекла.

Диазореактив Эрлиха II (раствор нитрита натрия 0,5%): натрия нитрит ч.д.а. или х.ч., (0,07 моль/л): 0,5 г нитрита натрия помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят водой до метки. Реактив стабилен в течение 24 ч.

Диазосмесь: Перед работой смешивают 10 мл диазореактива I и 0,3 мл диазореактива II.

7. Билирубин для построения калибровочного графика, 800 мг/л, или 1368 мкмоль/л. Коммерческие препараты кристаллического билирубина содержат разные примеси, которые могут мешать реакции азосочетания. Рекомендуется использовать набор Био-Ла-Тест «Билирубин-эталон», содержащий билирубин высокой степени чистоты с коэффициентом молярной экстинкции не менее $6,05 \cdot 10^4 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ при 453 нм и растворении в хлороформе. Растворы билирубина нестойкие, поэтому их готовят с добавлением белка в качестве стабилизатора. Коммерческие препараты билирубина не связаны с глюкуроновой кислотой.

8. Натрия карбонат, 0,1 моль/л: 10,6 г безводного Na_2CO_3 растворяют и доводят до 1 л водой.

9. Уксусная кислота, 4 моль/л: 25 мл ледяной уксусной кислоты доводят до 100 мл водой.

Оборудование: химические пробирки, бюретки, пипетки на 1,0 и 10 мл.

Ход определения. В 2 пробирки вводят реактивы как указано в схеме.

Ингредиенты	Опытная проба, мл	
	Общий билирубин	Связанный билирубин

Сыворотка	0,5	0,5
Кофеиновый реактив	1,75	-
Раствор хлорида натрия	-	1,75
	Стоять 5 мин, затем ФЭК (E ₁)	Диазосмесь - 0,25
Диазосмесь	Диазосмесь - 0,25	Стоять 5 мин, затем ФЭК (E ₃)
	Комнатная температура 20 минут	
	ФЭК (E ₂)	

Для определения связанного билирубина измерение проводят спустя 5—10 мин после добавления диазосмеси, так как при длительном стоянии в реакцию вступает несвязанный билирубин. Для определения общего билирубина пробу для развития окраски оставляют стоять 20 мин, после чего измеряют на фотометре. При дальнейшем стоянии окраска не изменяется.

Измерение проводят при длине волны 500-560 нм (зелёный светофильтр) в кювете с толщиной слоя 0,5 см против воды.

Расчёт производят по калибровочному графику. Находят содержание общего и связанного билирубина.

Алгоритм расчёта.

$$A = \text{контроль} = E_1 \cdot 0,9$$

$$B = \text{общий билирубин} = E_2 \cdot A$$

$$B = \text{прямой билирубин} = E_3 \cdot A$$

$$\Gamma = \text{непрямой билирубин} = B^* \cdot B^*$$

B и B* находим по калибровочной кривой.*

Построение калибровочного графика.

1. Основной раствор билирубина: в колбе вместимостью 50 мл растворяют 40 мг билирубина в 30-35 мл 0,1 моль/л раствора карбоната натрия Na_2CO_3 . Хорошо взбалтывают, не допуская образования осадка. Доводят до 50 мл 0,1 моль/л раствором Na_2CO_3 и несколько раз перемешивают. Раствор стоек только в течение 10 мин от начала приготовления. В дальнейшем происходит окисление билирубина.

2. Рабочий раствор билирубина: к 13,9 мл свежей негемолизированной сыворотки здорового человека добавляют 2 мл свежеприготовленного основного раствора билирубина и 0,1 мл 4,0 моль/л раствора уксусной кислоты. Хорошо перемешивают. При этом выделяются пузырьки углекислого газа. Рабочий раствор стоек в течение нескольких дней. Этот раствор содержит точно на 100 мг/л или 171 мкмоль/л, билирубина больше, чем сыворотка, взятая для приготовления раствора.

3. Чтобы исключить при расчётах количество билирубина, содержащегося в этой сыворотке, при измерении на фотометре из величины экстинкции калибровочных проб вычитают экстинкции соответствующих разведений компенсационной жидкости. Для приготовления компенсационной жидкости смешивают 13,9 мл той же сыворотки, которая использовалась для приготовления калибровочного раствора билирубина, 2 мл 0,1 моль/л раствора карбоната натрия и 0,1 мл 4,0 моль/л раствора уксусной кислоты.

4. Для построения калибровочного графика готовят ряд разведений с различным содержанием билирубина. К полученным разведениям прибавляют по 1,75 мл кофеинового реактива и по 0,25 мл диазосмеси. При появлении помутнения можно добавить по 3 капли 30% раствора едкого натра. Измерение проводят при тех же условиях, что и в опытных пробах,

через 20 мин. Из компенсационной жидкости готовят разведения, аналогичные калибровочным (как указано ниже) и далее обрабатывают их так же, как калибровочные пробы.

Пробирки	Рабочий раствор билирубина, мл	Изотонический раствор хлорида натрия, мл	Количество билирубина в пробе		Концентрация билирубина в сыворотке крови, мкмоль/л
			мг	мкмоль	
1	0,05	0,45	0,005	0,00855	17,1
2	0,1	0,4	0,01	0,0171	34,2
3	0,15	0,35	0,015	0,02565	51,3
4	0,2	0,3	0,02	0,0342	68,4
5	0,25	0,25	0,025	0,04275	85,5

Клиническое значение. В норме в крови здорового человека уровень общего билирубина составляет 4,5-20,5 мкмоль/л, из которых 6,4-17,1 мкмоль/л составляет непрямой билирубин. Возрастание концентрации билирубина в сыворотке крови выше 20,5 мкмоль/л называют гипербилирубинемией. Гипербилирубинемия свыше 30-35 мкмоль/л сопровождается желтушной окраской склер и кожных покровов.

Физиологическая гипербилирубинемия – это неонатальная физиологическая желтуха новорождённых. Общий билирубин повышен за счёт непрямого, что является следствием как интенсивного гемолиза эритроцитов, содержащих фетальный гемоглобин, так и незрелости гепатоцитов, содержащих недостаточное количества фермента конъюгации билирубина УДФГ-трансферазы.

Патологическая гипербилирубинемия может быть обусловлена различными причинами. Это состояние может быть следствием образования билирубина в количествах, превышающих способности нормальной печени

его экскретировать (надпечёночные желтухи); повреждений печени, нарушающих экскрецию билирубина в нормальных количествах (печёночная желтуха), а также вследствие закупорки желчевыводящих протоков, что препятствует выведению билирубина (подпеченочная желтуха).

Во всех этих случаях билирубин накапливается в крови и по достижении определённых концентраций диффундирует в ткани, окрашивая их в жёлтый цвет. Это состояние называется желтухой. Различают лёгкую форму желтухи (концентрация билирубина в крови до 86 мкмоль/л), среднетяжёлую (87-159 мкмоль/л) и тяжёлую (свыше 160 мкмоль/л).

В клинической практике наиболее широкое распространение получило деление желтух на гемолитические, паренхиматозные и обтурационные. Гемолитические и паренхиматозные желтухи — неконъюгированная, а обтурационные — конъюгированная гипербилирубинемия. В некоторых случаях желтуха может быть смешанной по патогенезу.

Так, при длительном нарушении оттока жёлчи (механическая желтуха) в результате вторичного поражения паренхимы печени может нарушаться экскреция прямого билирубина в жёлчные капилляры, и он непосредственно попадает в кровь; кроме того, снижается способность печёночных клеток синтезировать глюкурониды билирубина, вследствие этого количество непрямого билирубина также увеличивается.

Причины увеличения содержания билирубина в крови могут быть следующими.

- Увеличение интенсивности гемолиза эритроцитов.
- Поражение паренхимы печени с нарушением её билирубин выделительной функции.
- Нарушение оттока жёлчи из жёлчных путей в кишечник.

- Нарушения активности ферментного звена, обеспечивающего биосинтез глюкуронидов билирубина.

- Нарушение печёночной секреции конъюгированного (прямого) билирубина в жёлчь.

Содержание непрямого билирубина повышается при гемолитических анемиях, пернициозной анемии, при желтухе новорождённых, синдромах Жильбера, Криглера-Найяра, Ротора.

Вопросы и задания для самоконтроля:

1. Хромопротеины: классификация, биологическая роль.
2. Гемоглобин: строение, свойства, биологическая роль. Типы гемоглобина. Аномальные формы гемоглобина при гемоглобинозах (гемоглобинопатии, талассемии). Производные гемоглобина.
3. Этапы синтеза гемоглобина, регуляция процесса.
4. Порфирины: структура, схема реакций биосинтеза протопорфирина IX и гема. Регуляция синтеза порфиринов.
5. Наследственные нарушения биосинтеза порфиринов. Типы порфирий.
6. Катаболизм гемоглобина (схема). Образование желчных пигментов. Роль печени в обмене желчных пигментов.
7. Нарушение обмена желчных пигментов.
8. Патобиохимия и диагностика различных видов желтух.

4.4 ИССЛЕДОВАНИЯ СВОЙСТВ ГОРМОНОВ

Гормоны – биологически активные вещества, которые выделяются в кровь эндокринными железами и гуморальным путём (через кровь, лимфу, слюну, спинномозговую жидкость) регулируют все виды обмена веществ и физиологические процессы. Гормоны являются универсальными регуляторами жизнедеятельности организма. Они играют важную роль в поддержании гомеостаза, влияют на важнейшие жизненные процессы (рост, метаболизм, развитие, иммунную защиту, размножение, поведение и адаптацию организма к условиям существования).

Гормоны осуществляют свои эффекты относительно контроля метаболических процессов в клетках-мишенях путём взаимодействия со специфическими рецепторами. В зависимости от локализации этих рецепторов существуют разные механизмы действия гормонов. Для гормонов белково-пептидной природы характерными являются мембранный и мембранно-цитозольный механизмы действия.

Для стероидных и тиреоидных гормонов характерен цитозольный механизм действия. Представителями стероидных гормонов являются гормоны коры надпочечников, половых желёз. К тиреоидным гормонам относятся гормоны щитовидной железы. Изучение этих гормонов имеет важное значение для понимания процессов минерального и основного обменов, полового развития.

Эйкозаноиды – соединения липидной природы, принадлежащие к биорегуляторам клеточных функций, а также во многих случаях они выступают посредниками в реализации определённых эффектов других гормонов и медиаторов на клетку. Такие свойства позволяют рассматривать нарушения их обмена как важные факторы патогенеза гипертонической

болезни, бронхиальной астмы, слабости родовой деятельности и т.п., а также применять препараты эйкозаноидов в фармакотерапии.

Работа 86. Качественные реакции на инсулин

Биуретовая реакция

Пошаговое выполнение работы:

1. К 5 каплям исследуемого раствора (инсулина) прибавляют 5 капель 10% р-ра едкого натра, 2 капли 1% р-ра сульфата меди и всё перемешивают.
2. Содержимое пробирки приобретает фиолетовый цвет.
3. Нельзя добавлять избыток сульфата меди, так как синий осадок гидрата окиси меди маскирует характерное фиолетовое окрашивание биуретового комплекса белка.

Реакция Фоля.

Реакция позволяет обнаружить слабосвязанную серу цистеина белков.

Пошаговое выполнение работы:

1. К 10 кап. инсулина добавляют 10 кап. 10% р-ра едкого натрия и кипятят.
2. После охлаждения вносят несколько капель уксуснокислого свинца.
3. Появляется бурый или чёрный осадок сернистого свинца.

Работа 87. Обнаружение йода в препарате щитовидной железы

Принцип метода. При щелочном гидролизе тироксина образуется иодид калия, из которого йод вытесняется йодатом калия. Выделившийся свободный йод даёт с крахмалом синее окрашивание.

Пошаговое выполнение работы:

1. Приготовление реагентов. В лаборатории кафедры (!) проводят гидролиз аптечного тиреоидина по следующей методике. В фарфоровой ступке растирают 10 таблеток тиреоидина.

2. Полученный порошок пересыпают в колбу для гидролиза и заливают 25 мл 10 % раствора NaHCO_3 .

3. Перемешивают, закрывают пробкой с обратным холодильником и ставят на песчаную баню.

4. Содержимое пробирок кипятят 10–15 мин и охлаждают.

5. К 1 мл гидролизата, полученного в лаборатории, помещают в пробирку и нейтрализуют 10%-м раствором серной кислоты, добавляя её по каплям до слабокислой реакции на лакмус.

6. Затем добавляют 2 капли раствора крахмала и 2-3 капли раствора KIO_3 .

Выделившийся йод окрашивает жидкость в синий цвет.

Вывод. Записать полученный результат и дать его клинико-диагностическую оценку.

Работа 88. Качественная реакция на адреналин

Принцип метода. Адреналин и норадреналин образуются из аминокислоты тирозина и являются производными пирокатехина. Присутствие в их структуре пирокатехинового кольца определяет химические свойства этих гормонов. Они легко окисляются в нейтральных растворах с образованием красного пигмента – адренохрома, который при последующей полимеризации образует меланины.

Пошаговое выполнение работы:

Реакция с хлоридом железа (III).

1. В пробирку вносят 3 капли раствора адреналина и 1 каплю 1% раствора хлорида железа (III). Проявляется изумрудно-зелёное окрашивание, которое затем при добавлении 1 капли раствора гидроксида натрия приобретает вишнёво-красный цвет. Реакция обусловлена тем, что пирокатехиновое ядро образует с ионами железа (III) соединения типа фенолятов.

Вывод. Записать полученный результат и дать его клинико-диагностическую оценку.

Работа 89. Обнаружение 17-кетостероидов в моче

Принцип метода. Метод основан на взаимодействии 17-кетостероидов с м-динитробензолом в щелочной среде с образованием продуктов конденсации розово-фиолетового цвета.

Пошаговое выполнение работы:

1. В пробирку вносят 20 капель мочи и 30 капель раствора м-динитробензола, который добавляют медленно, так, чтобы он стекал по стенке пробирки.

2. Пробирку не встряхивать. Затем по стенке пробирки добавляют 6 капель раствора гидроксида натрия.

3. Верхний слой жидкости окрашивается в розово-фиолетовый цвет.

Вывод. Записать полученный результат и дать его клинико-диагностическую оценку.

Вопросы и задания для самоконтроля:

1. Общие представления о гормонах и их свойствах. Классификация гормонов по химическому строению и по механизму действия.

2. Понятие об органах- и клетках-мишенях гормонов. Типы рецепторов: особенности структуры и локализации в клетке.

3. Мембранно-внутриклеточный механизм действия пептидных гормонов и биогенных аминов. Функция компонентов системы передачи гормонального сигнала в клетку: G-белков, аденилатциклазы, фосфодиэстеразы, фосфолипазы C, вторичных посредников, протеинкиназ. Механизмы действия адреналина.

4. Молекулярные механизмы действия инсулина. Рецепторные тирозинкиназы.

5. Общие положения о цитозольном механизме действия липофильных гормонов: стероидных, тиреоидных.

6. Гормоны коры надпочечников (глюкокортикоиды, минералокортикоиды): структура, контроль секреции, особенности транспорта в крови, влияние на обмен веществ. Нарушения секреции гормонов коры надпочечников: болезни Иценко-Кушинга и Аддисона.

7. Гормоны половых желёз – андрогены, эстрогены, прогестерон: структура, особенности транспорта в крови, регуляция секреции, влияние на обмен веществ. Нарушения синтеза и секреции половых гормонов.

8. Тиреоидные гормоны (трийодтиронин, тироксин): особенности синтеза и секреции, транспорта в крови, влияния на обмен веществ. Нарушения обмена веществ при гипо- и гипертиреозе.

9. Эйкозаноиды (простагладины, тромбоксаны, простациклины, лейкотриены): пути образования, биохимические эффекты. Использование лекарственных препаратов в регуляции обмена эйкозаноидов.

10. Медиаторы и гормоны иммунной системы (цитокины, интерфероны): химическая природа, локализация синтеза, биохимические эффекты.

4.5 ИССЛЕДОВАНИЕ МЫШЦ И СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

Выполнение специфических функций мышечной и соединительной тканями обусловлено их строением, а также совокупностью процессов обмена веществ, протекающих в данных тканях. Широкий спектр заболеваний, обусловленный биохимическими нарушениями в мышечной и соединительной тканях требует от будущего врача тщательного изучения обмена веществ данных тканей в норме и при некоторых патологических состояниях.

Работа 90. Определение креатинина в сыворотке крови

Принцип метода: Креатинин при взаимодействии с пикриновой кислотой в щелочной среде образует окрашенное в жёлто-красный цвет соединение, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации креатинина. В сыворотке крови креатинин определяется после депротеинирования раствором трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Определение не совсем специфично, интерферируют вещества с активной метиленовой группой и некоторые восстанавливающие вещества, например, глюкоза, ацетон, ацетоуксусная и пировиноградная кислоты.

Пошаговое выполнение работы:

1. Готовят реакционные смеси в соответствии со схемой:

Отмерить в пробирку, мл	Опытная проба	Холостая проба
Сыворотка	1,0	-
Дистиллированная вода	2,0	3,0
1,22 М раствор ТХУ	1,0	1,0
Перемешать, центрифугировать 5 минут при 3000 об/мин		
Надосадочная жидкость	2,0	2,0
2,3 н раствор NaOH	1,0	1,0
0,04 М р-р пикриновой кислоты	1,0	1,0

Надосадочная жидкость	2,0	2,0
-----------------------	-----	-----

2. Перемешать, выдержать 20 минут при комнатной температуре, фотометрировать против холостой пробы при длине волны 490-560 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм.

3. Расчёт концентрации креатинина проводят по формуле:

$$C = E_{\text{оп}} / E_{\text{к}} \cdot 177$$

где: С – концентрация креатинина в опытной пробе, мкмоль/л; $E_{\text{оп}}$ – экстинкция опытной пробы; $E_{\text{к}}$ – экстинкция калибровочной пробы = 0,2; 177 – концентрация креатинина в калибровочной пробе, мкмоль/л.

Клинико-диагностическое значение: Увеличение концентрации креатинина в сыворотке крови наблюдается при почечной недостаточности и прогрессирующих диффузных заболеваниях почек, а также при закупорке мочевых путей, кишечной непроходимости, тяжёлом диабете, декомпенсации сердца, острой жёлтой атрофии печени, механической желтухе, гипофункции надпочечников, голодании и беременности. Понижение уровня креатинина в сыворотке крови наблюдается у больных анемией после назначения АКТГ.

Параллельное определение концентрации креатинина в крови и моче имеет большое значение для исследования функционального состояния почек. Увеличение содержания креатинина в моче отмечается при приёме мясной пищи, тяжёлой мышечной работе, лихорадочных состояниях, пневмонии, выраженной недостаточности функции печени, после снятия кровоостанавливающего жгута. Понижение содержания креатинина в моче – при мышечной атрофии, голодании, дегенерации почек, лейкемии, в старческом возрасте.

Нормальное содержание креатинина в сыворотке крови: у женщин – 53-97 мкмоль/л; у мужчин – 80-115 мкмоль/л.

4.6 ИССЛЕДОВАНИЕ КОСТНОЙ ТКАНИ И ТКАНЕЙ ЗУБА. МИНЕРАЛЬНЫЕ И ОРГАНИЧЕСКИЕ КОМПОНЕНТЫ ТКАНЕЙ ЗУБА

Костная ткань выполняет не только механическую функцию, но и другие важные для организма функции: принимает активное участие в обмене веществ, в частности в поддержании гомеостаза минерального состава биологических жидкостей, принимает участие в процессах кроветворения, причём эта функция присуща не только костному мозгу, но и всей костной ткани в целом.

Зубы – наиболее минерализованные органы, обеспечивающие механическую обработку пищи, а также связную речь, и выполняют определённую эстетическую функцию. Поэтому знание метаболизма костной ткани и тканей зуба в норме и при патологиях необходимы для будущего врача – стоматолога.

Работа 91. Определение кальция в сыворотке крови трилонометрическим титрованием в присутствии мурексида

Принцип метода: Свободный мурексид в щелочной среде имеет синевioletовый цвет, а соединяясь в комплекс с кальцием - розово-оранжевый. При титровании раствором трилона Б этот комплекс разрушается и связанный мурексид высвобождается. Проба приобретает фиолетовый цвет.

Пошаговое выполнение работы:

1. Приготовить раствор мурексида: несколько кристаллов мурексида на кончике скальпеля (30-40 мг) перенести в сухую пробирку и добавить 1 мл дист. воды.

2. В коническую колбу для титрования вносят 20 мл дист. воды; 0,2 мл 9N раствора NaOH и по каплям добавляют раствор мурексида до появления

фиолетовой (сиреневой) окраски. Затем добавляют точно 1 мл сыворотки крови - появляется розовая окраска. Раствор титруют трилоном Б до появления прежнего (сиреневого) цвета индикатора. Для установления титра раствора трилона Б проводят титрование, используя вместо сыворотки крови стандартный раствор кальция. Расчёт проводят по формуле:

$$X = C \cdot A / B$$

где: X – концентрация кальция в сыворотке крови (ммоль/л); A – объём раствора трилона Б, израсходованный на титрование опытной пробы (мл); B – объём раствора трилона Б, израсходованный на титрование стандартного раствора кальция (мл); C – концентрация кальция в стандартном растворе (2,0 ммоль/л).

Нормальное содержание общего кальция в сыворотке крови 2,25-2,75 ммоль/л (9,0-11,0 мг %).

Клинико-диагностическое значение: Гиперкальциемия может быть физиологической и патологической. *Физиологическая гиперкальциемия* имеет место у новорождённых детей после 4-го дня жизни, у недоношенных детей, а также после принятия пищи (алиментарная). *Патологическая гиперкальциемия* наблюдается при гиперпаратиреозидизме, гипervитаминозе D, усиленном распаде костей, Аддисоновой болезни, акромегалии, лейкозе, гангрене, перитоните (вследствие распада клеток, содержащих кальций), при желтухе и сердечной недостаточности. *Гипокальциемия* отмечается при нарушении в кишечнике всасывания ионов кальция в результате стеатореи или гиповитаминоза D, в детском возрасте при спазмофилии (тетании), при некоторых заболеваниях почек (особенно хронических нефритах, нефрозах), поносе, остром панкреатите, гипонатриемии и гипофункции паращитовидных желёз.

4.7 ИССЛЕДОВАНИЕ КРОВИ

Изучение функций, химического состава крови в норме и при патологических состояниях играет большое значение для понимания врачом роли крови в координации процессов метаболизма веществ и объединения этих процессов в единую систему, называемую организм человека. Умение анализировать основные фракции белков плазмы (сыворотки) крови у здоровых людей и при патологических состояниях (гипо-, гипер-, пара-, диспротеинемиях) имеет большое диагностическое и прогностическое значение для врача.

Небелковые компоненты плазмы крови делятся на азотистые (которые остаются в плазме и сыворотке крови после осаждения белков - остаточный азот) и безазотистые (углеводы, липиды, органические кислоты и электролиты) и имеют определённые значения концентраций и их соотношений у здорового человека. Отклонение от этих показателей (на основании данных анализа крови) свидетельствует о наличии патологий.

Изучение буферных систем крови и нарушений кислотно-щелочного баланса - патологических состояний, характеризующихся избыточным накоплением в организме кислых (ацидоз) и щелочных (алкалоз) соединений, играет важную роль для их коррекции.

Работа 92. Количественное определение активности аспаратаминотрансферазы (АсАТ) в сыворотке крови

В результате трансаминирования α -кетоглутаровой кислоты с L-аспарагиновой кислотой, происходящего под действием аспаратаминотрансферазы, образуются L-глутаминовая и щавелевоуксусная кислоты, последняя самопроизвольно декарбоксилируется с образованием пировиноградной кислоты. При добавлении 2,4-динитрофенилгидразина в

щелочной среде образуется окрашенный раствор гидразона пировиноградной кислоты, интенсивность окраски которого пропорциональна активности фермента.

Пошаговое выполнение работы:

1. Готовят реакционные смеси в соответствии со схемой:

Отмерить в пробирку, мл	Отмерить в пробирку, мл	Отмерить в пробирку, мл
Субстратно-буферный раствор	0,5	0,5
Инкубация 3 минуты при 37 °С		
Стоп реагент	-	0,5
Сыворотка крови	0,1	0,1
Инкубация 30 минут при 37 °С		
Стоп реагент	0,5	-
Инкубация 20 минут при комнатной температуре		
0,4 N NaOH	5	5
Инкубация 10 минут при комнатной температуре		

2. Измеряют оптическую плотность опытной пробы против холостой при 490-540 нм (светло-зелёный светофильтр) в кюветах 10 мм.

3. Расчёт активности фермента проводят по калибровочному графику.

В сыворотке крови здоровых людей активность АсАТ равна 0,1-0,45 мкмоль/мл·час

Клинико-диагностическое значение: Органические нарушения при острых и хронических поражениях сопровождаются деструкцией клеток и приводят к выходу трансаминаз из очага поражения в кровь. Так, при инфаркте миокарда уровень АсАТ сыворотки крови уже через 3-5 часов после инфаркта резко увеличивается в 20-30 раз. Возрастание активности чётко выражено спустя 24-36 часов и лишь на 3-7 день активность фермента снижается до нормы.

Определение содержания натрия в сыворотке крови

Принцип метода: Содержащийся в образце натрий связывается осаждающим реагентом. Оставшиеся в растворе ионы осаждающего реагента образуют окрашенный комплекс с тиогликолятом. Концентрация натрия пропорциональна разности между контрольной (без преципитации) и опытной пробами.

Пошаговое выполнение работы:

1. Подготовьте пробы следующего состава:

Растворы, мл	Опытная проба	Контрольная проба
Реагент №1	1,0	1,0
Сыворотка крови	0,02	-
Вода дистиллированная	-	0,02

2. Пробы тщательно перемешивают и инкубируют 5 минут при температуре 18-25°C, затем снова перемешивают (не менее 30 с) и инкубируют 30 минут в темноте.

3. Затем пробы центрифугируют при 1000 об/мин. в течении 10 минут. Для дальнейшего анализа используют прозрачную надосадочную жидкость (супернатант).

4. Смешивают 0,02 мл супернатанта опытной и контрольной проб с 2 мл реагента № 2 и через 5 минут измеряют оптическую плотность опытной и контрольной проб против воды при длине волны 365 или 405 нм. Окраска стабильна 25 минут после окончания инкубации при предохранении от прямого света.

Обратите внимание: интенсивность окраски проб обратно пропорциональна концентрации натрия в исследуемом образце.

Расчёт концентрации натрия в исследуемом материале проводят по формуле:

$$C = E_{к.} - E_{оп.} / E_{к.} - E_{кал.} \cdot 150$$

где: C – концентрация натрия в опытной пробе, ммоль/л; $E_{\text{оп.}}$ – экстинкция опытной пробы; $E_{\text{к.}}$ – экстинкция контрольной пробы; $E_{\text{кал.}}$ – экстинкция калибровочной пробы (результат выдаётся лаборантом); 150 – концентрация натрия в калибраторе, ммоль/л.

Референтные величины концентрации натрия в плазме крови – 135-155 ммоль/л.

Клинико-диагностическое значение: *Гипонатриемия* - снижение концентрации натрия в плазме крови ниже 135 ммоль/л. Развитию гипонатриемии способствуют:

- приём диуретиков, осмотический диурез (болезни, при которых накапливаются осмотически активные соединения в крови: глюкоза, мочевины), заболевания почек (острый и хронический пиелонефрит, обтурация мочевыводящих путей, поликистоз почек);

- потеря натрия, связанная с болезнями желудочно-кишечного тракта (рвота, фистула тонкой кишки и др.);

- применение антибиотиков группы аминогликозидов (гентамицина);

- недостаточность коры надпочечников (болезнь Аддисона);

Гипернатриемия - увеличение концентрации натрия в сыворотке выше 150 ммоль/л. Всегда связана с гиперосмолярностью. Гипернатриемия могут вызвать:

- дегидратация при водном истощении: длительном потоотделении без соответствующей водной компенсации, потеря воды желудочно-кишечным трактом (диарея, рвота), кожей (ожоги);

- несахарный диабет (снижение чувствительности рецепторов почек к АДГ);

- почечные заболевания, протекающие с олигурией;

- гиперальдостеронизм (избыточная секреция альдостерона аденомой или злокачественной опухолью надпочечников - синдром Кушинга).

Натрий относится к пороговым веществам и увеличение его концентрации в крови приводит к повышению его экскреции. Для суждения о балансе натрия в организме необходимо одновременно определять его содержание в крови и моче.

Работа 93. Определение хлоридов в биологических жидкостях (сыворотке крови или моче)

Принцип метода: Хлоридион в сильно кислой среде высвобождает из роданида ртути (II) ион роданида, который реагирует с ионами железа (III) с образованием окрашенного продукта. Интенсивность окраски образовавшегося роданида железа пропорциональна концентрации ионов хлорида в пробе.

Пошаговое выполнение работы:

1. Подготовка образца мочи: образец разводят в 2 раза дистиллированной водой и добавляют каплю азотной кислоты до кислого pH.
2. Анализ проводится в соответствии со схемой, приведённой в таблице:

Отмерить в кювету, мл	Опытная проба	Холодная проба
Рабочий реагент	5,0	-
Сыворотка крови или разведённая моча	0,05	0,05
Холодный реагент	-	5,0

3. Смешивают все компоненты реакционной смеси и выдерживают её 10 минут при комнатной температуре.

4. Измеряют оптическую плотность опытной пробы против холостой. Фотометрирование проводится при длине волны 450 (440-480) нм в диапазоне (0 - 1,0) ед. оптической плотности и длине оптического пути 10 или 5 мм.

5. Расчёт концентрации хлоридов проводят по формуле:

$$E_{оп. С} = E_{оп.} / E_{кал.} \cdot 100$$

где: С – концентрация хлоридов в опытной пробе, ммоль/л; $E_{оп.}$ – экстинкция опытной пробы; $E_{кал.}$ – экстинкция калибровочной пробы (результат выдаётся лаборантом); 100 – концентрация хлоридов в калибровочном растворе, ммоль/л.

Для расчёта концентрации хлоридов в суточной моче полученное выше значение умножают на 2 (коэффициент разбавления) и объем суточной мочи, выраженный в литрах (получают ммоль/сут).

Референтные величины концентрации хлоридов: в сыворотке крови – 98-107 ммоль/л; в моче – 250 ммоль/сут.

Клинико-диагностическое значение: *Гипохлоремия* могут вызвать такие заболевания и состояния, как:

- повышенное выделение хлора с потом в условиях жаркого климата, при лихорадочных состояниях, при диареях;
- диабетический ацидоз, который обычно сопровождается переходом хлора из крови в ткани;
- почечный диабет, вследствие большой потери хлора с мочой.
- заболевания надпочечников с нарушением образования минералокортикоидов.

Гиперхлоремия разделяют на абсолютную, развивающуюся при нарушении выделительной функции почек, и относительную, связанную с обезвоживанием организма и сгущением крови. При нефрозе, нефритах и

особенно нефросклерозе наступает задержка солей в организме и развивается гиперхлоремия. Недостаточное поступление воды в организм, диарея, рвота, потеря жидкостей и солей при ожогах могут привести к обезвоживанию организма и развитию относительной гиперхлоремии.

Гиперхлоремия может иметь место при декомпенсации сердечно-сосудистой системы, развитии отеков, поступлении с пищей больших количеств хлорида натрия. Кроме того, гиперхлоремия возможна при алкалозе, при рассасывании отёков, экссудатов и транссудатов.

Вопросы и задания для самоконтроля:

1. Биохимические функции крови в организме человека.
2. Сравнительная характеристика химического состава плазмы и сыворотки крови в норме.
3. Основные фракции белков плазмы и сыворотки крови (альбумины, α -, β -, γ -глобулины): клинико-биохимическая характеристика, изменение содержания при патологиях.
4. Понятие о гипо-, гипер-, пара- и диспротеинемиях.
5. Система гемостаза, антикоагулянтная и фибринолитическая системы крови. Наследственные нарушения процесса свёртывания крови.
6. Клинико-биохимическая характеристика белков острой фазы воспаления.
7. Классификация ферментов плазмы крови, их использование при диагностике заболеваний
8. Основные органические небелковые азотсодержащие и безазотистые компоненты плазмы крови, их характеристика и значение их определения при патологиях.
9. Общие представления о минеральном составе плазмы крови в норме.

10. Транспорт катионов металлов, продуктов катаболизма гемоглобина и липидов в крови. Исследование липопротеинов плазмы в диагностике дислипидемий.

11. Буферные системы крови в поддержании кислотно-основного равновесия. Нарушения кислотно-основного равновесия: типы ацидоза и алкалоза, механизмы их возникновения.

4.8 ИССЛЕДОВАНИЕ МОЧИ

Почки – один из важных органов организма человека и животных, основная задача которого заключается в поддержании постоянства внутренней среды организма. Это главный секреторный орган, вырабатывающий из компонентов плазмы жидкость – мочу.

Почки участвуют в регуляции водно-электролитного баланса, поддержании кислотно-основного равновесия, выделении азотистых шлаков, поддержании осмотического давления жидкостей организма, регуляции кровяного давления, стимуляции эритропоэза и т.д.

Цель изучения раздела: Изучить механизм образования мочи, роль почек в поддержании кислотно-щелочного равновесия, особенности обмена веществ в почках при нормальных и патологических состояниях, а также химический состав мочи в норме и при патологических состояниях.

Работа 94. Количественное определение фенилпировиноградной кислоты в моче

Цель работы: научиться количественно определять фенилпировиноградную кислоту (ФПВК) в моче, уметь объяснить причины ее появления. Фенилпировиноградная кислота – патологический продукт обмена фенилаланина, который появляется в крови и моче при отсутствии фенилала-нингидроксилазы, что нарушает нормальное превращение фенилаланина в тирозин.

Принцип метода определения основан на способности фенилпировата образовывать с ионами трехвалентного железа комплексное соединение зеленого цвета.

Пошаговое выполнение работы:

1. 1,0 мл мочи развести в 10 раз.

2. К 5 мл разбавленной мочи добавить 10 капель 10% цитрата железа и 10 капель 10% лимонной кислоты.

3. Смесь оставить на 5 минут для развития окраски.

4. Раствор колориметрировать на ФЭКе при красном светофильтре в кювете с рабочей длиной 5 мм против контроля (разбавленная в 10 раз моча).

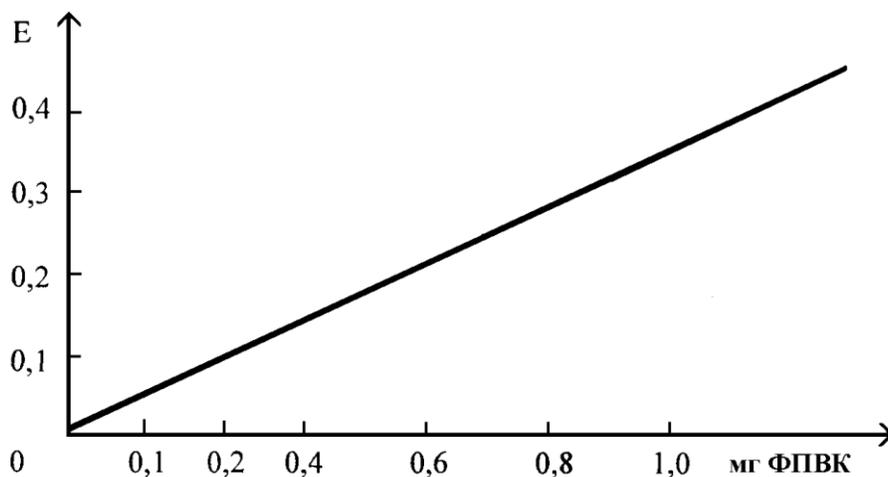
5. Рассчитать содержание пировиноградной кислоты, используя стандартную кривую, построенную по растворам фенилпировиноградной кислоты с известной концентрацией, найти содержание ФПВК в исследуемой моче.

$$X = a \cdot v / 0,5$$

где: а – содержание ФПВК в пробе по кривой, в – суточный диурез (1200-1500 мл), 0,5 – объем пробы (неразбавленной мочи).

В норме фенилпировиноградная кислота в моче отсутствует, при фенилкетонурии количество может достигать 500-1000 мг/сутки.

Кривая для определения ФПВК в моче



Работа 95. Скрининг-тесты для выявления наследственных нарушений обмена аминокислот

Цель работы: научиться обнаруживать в моче патологические продукты обмена аминокислот, характеризующие наследственные нарушения метаболизма.

А. Обнаружение фенилпировиноградной кислоты в моче

Принцип: фенилпировиноградная кислота с ионами трёхвалентного железа даёт комплексное соединение сине-зелёного цвета.

Пошаговое выполнение работы

1. К 10 каплям мочи добавить 10 капель 10% FeCl_3 .
2. При наличии в моче фенилпировиноградной кислоты развивается сине-зелёное окрашивание, интенсивность которого пропорциональна количеству патологического продукта.

Б. Обнаружение гомогентизиновой кислоты

Принцип: гомогентизиновая кислота, накапливающаяся в крови и появляющаяся в моче при нарушении обмена тирозина, даёт голубое окрашивание при взаимодействии с солями трёхвалентного железа.

Пошаговое выполнение работы:

1. К 2-3 мл мочи добавить 3-4 капли трёххлористого железа.
2. Развивается голубое окрашивание, при добавлении 3-4 капель 10% гидроксида натрия переходящее в коричневое.
3. Данные оформить в виде протокола, сделать вывод.

Вопросы и задания для самоконтроля:

1. Механизм образования мочи.
2. Роль почек в поддержании кислотно-щелочного равновесия.

3. Особенности обмена веществ в почках при нормальных и патологических состояниях.

4. Общие свойства мочи.

5. Химический состав мочи.

6. Патологический состав мочи.

ГЛОССАРИЙ ПО БИОХИМИИ

1. Абсорбтивный период - поступление в организм, переваривание и усвоение белков, жиров и углеводов.
2. Агрекан - основной структурный элемент хрящевого матрикса, состоящий из сотен протеогликановых мономеров, нековалентно присоединённых к одной молекуле глюкуроновой кислоты.
3. Аденилатциклаза - фермент плазматической мембраны, катализирующий реакцию образования цАМФ из АТФ.
4. Аденозинмонофосфат (АМФ) - мононуклеотид, состоящий из аденина, рибозы и остатка фосфорной кислоты.
5. Аденозинтрифосфат (АТФ) - макроэргическое вещество, являющееся главным переносчиком химической энергии в живой клетке.
6. Адипоциты - клетки жировой ткани.
7. Адреналин - гормон мозгового вещества надпочечников.
8. Адренокортикотропный гормон (АКТГ) - вырабатывается в аденогипофизе, стимулирует кору надпочечников.
9. Азотистый баланс - соотношение количества азота, поступившего с пищей и выведенного из организма; у детей и беременных - положительный, у взрослых - нулевой, у престарелых - отрицательный.
10. Активный центр - участок молекулы фермента, на котором происходит реакция.
11. Аланин - неполярная, заменимая протеиногенная аминокислота.
12. Алкалоз - сдвиг рН крови в щелочную сторону.
13. Алкогольдегидрогеназа - фермент класса оксидоредуктаз, катализирующий реакцию окисления этанола.
14. Аллопуринол - структурный аналог гипоксантина, применяется в лечении подагры.

15. Альбумин - простой, глобулярный, кислый белок.
16. Альдостерон - стероидный гормон коры надпочечников, регулирующий минеральный обмен.
17. Амилаза (Р-панкреатическая, S-слюнных желёз) - фермент класса гидролаз, расщепляет α -1,4-гликозидные связи амилозы и амилопектина.
18. Аминоацил-тРНК-синтетаза - фермент, катализирующий связывание аминокислот с соответствующими тРНК.
19. Аминокислота - мономер, из которого состоят белки (строго говоря, они состоят из α -аминокислот). По свойствам боковых радикалов различают неполярные, полярные, кислые и щелочные аминокислоты. Благодаря разнообразию химических свойств аминокислот достигается разнообразие функций белков.
20. Аминопептидаза - гидролаза, катализирующая отщепление N-концевой аминокислоты.
21. Аминотрансфераза - фермент, катализирующий перенос аминогруппы с аминокислоты на кетокислоту с участием пиридоксальфосфата.
22. Анаболизм - энергозависимый процесс синтеза более сложных веществ из относительно простых.
23. Антитела - защитные белки плазмы крови, то же, что иммуноглобулины. Антитела обладают способностью специфически связываться с чужеродными молекулами - антигенами, что помогает их обезвредить.
24. Апоптоз - запрограммированная смерть клеток.
25. Арахидоновая кислота - эйкозатетраеновая жирная кислота, входит в состав фосфолипидов, является источником эйкозаноидов (простагландины и др.).

26. Аргинин - протеиногенная, незаменимая, положительно заряженная аминокислота, содержащая в боковом радикале гуанидин.
27. Аспарагин - протеиногенная полярная аминокислота; амид аспарагиновой кислоты.
28. Аспарагиновая кислота - дикарбоновая протеиногенная аминокислота.
29. Аспирин (ацетилсалициловая кислота) - нестероидное противовоспалительное средство, необратимый ингибитор циклооксигеназы.
30. Ацетилхолин - сложный эфир уксусной кислоты и холина, является медиатором холинэргических нейронов коры головного мозга, двигательных нервах и постганглионарных нейронах парасимпатического звена вегетативной нервной системы.
31. Ацидоз - сдвиг кислотно-основного равновесия в кислую сторону, встречается при некомпенсированном сахарном диабете.
32. Аэробное окисление глюкозы - полное окисление глюкозы до CO_2 и H_2O , включает подготовительный этап - образование двух триоз, гликолитическую оксидоредукцию, окислительное декарбоксилирование пирувата и цикл трикарбоновых кислот.
33. α -спираль - разновидность вторичной структуры белка, в которой полипептидная цепочка закручивается в спираль шагом 3,6 аминокислотных остатка на виток спирали.
34. Белок - биополимер, состоящий из α , L- аминокислот.
35. Билирубин - продукт восстановления биливердина, пигмент красного цвета.
36. Биосинтез белка - процесс, включающий транскрипцию, активацию аминокислот, трансляцию и посттрансляционную модификацию белковых молекул.

37. Биотин - (витамин Н), входит в состав кофермента карбоксилаз биоцитина.

38. β -структура - разновидность вторичной структуры белка, в которой развёрнутые участки одной или нескольких полипептидных цепочек связываются друг с другом водородными связями.

39. Вазопрессин (антидиуретический гормон, АДГ) - образуется в нейросекреторных клетках гипоталамуса, поступает в заднюю долю гипофиза, откуда выделяется в кровь.

40. Валин - протеиногенная, неполярная, незаменимая аминокислота; служит одним из исходных веществ при биосинтезе пантотеновой кислоты (витамина В₅).

41. Витамины - низкомолекулярные вещества, которые необходимы в чрезвычайно малых количествах для нормального развития и функционирования организма.

42. Водородный показатель - то же, что рН, отрицательный логарифм концентрации ионов водорода; $pH = -\lg[H^+]$.

43. Вторичная структура белка - характеризует форму полипептидной цепи, которая может быть спиралевидной (α -структура), складчатой (β -структура) или неупорядоченной.

44. Высаливание - метод очистки белков, основанный на различной растворимости разных белков в растворах солей.

45. Высокоэнергетические соединения - природные вещества, содержащие богатые энергией (макроэргические) связи, при гидролизе которых выделяется более 15 кДж/моль энергии.

46. Гель-проникающая хроматография - вариант хроматографии, в котором разделение смеси веществ происходит по молекулярной массе (точнее, по размеру) их молекул благодаря различной способности молекул

разного размера входить в поры, имеющиеся в гранулах нерастворимого сорбента.

47. Гем - небелковая часть (простетическая группа) гемоглобина, миоглобина, каталазы, пероксидазы и цитохромов.

48. Гемоглобин - гемсодержащий хромопротеин животных, способный обратимо связываться с кислородом, обеспечивая его перенос в ткани.

49. Гидрофильные вещества - вещества, молекулы которых вступают во взаимодействие с молекулами воды. Они или растворяются в воде, или смачиваются ею. Обычно это вещества с ионными или полярными ковалентными связями.

50. Гидрофобные вещества - вещества, молекулы которых почти не вступают во взаимодействия с молекулами воды. Они не растворяются в воде и не смачиваются ею. Обычно это вещества с неполярными ковалентными связями.

51. Гидроксиапатит $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ - основной минеральный компонент костной ткани, а также, эмали, дентина и цемента зуба.

52. Гидрофобное взаимодействие - притяжение между неполярными частицами в водной среде.

53. Гистоны - щелочные белки, связывающиеся с ДНК в клетках эукариот и образующие нуклеосомы.

54. Гликолиз - процесс распада глюкозы на трёхуглеродные органические кислоты, сопровождающийся синтезом АТФ из АДФ и неорганического фосфата в соотношении 2 моля АТФ на 1 моль глюкозы. При анаэробном гликолизе молекула глюкозы распадается на две молекулы молочной кислоты, а при аэробном – пировиноградной кислоты, которая затем подвергается дальнейшему окислению. Протекает в цитозоле.

55. Гликолипиды - липиды, ковалентно связанные с углеводными остатками.

56. Гликопротеины - белки с ковалентно присоединёнными углеводными остатками, обычно в гликопротеинах белок преобладает по массе над углеводами. Как правило, гликопротеины – секретируемые белки или белки наружной мембраны.

57. Глутатион - трипептид γ -глутамилцистеинилглицин. Синтезируется из L-цистеина, L-глутаминовой кислоты и глицина.

58. Глюкагон - гормон α -клеток островков Лангерганса поджелудочной железы.

59. Глюкоза крови - у детей до 14 лет 3,33 - 5,55 ммоль/л, у взрослых 3,89 - 5,83 ммоль/л, с 60 лет уровень глюкозы в норме возрастает до 6,38 ммоль/л.

60. Глюкозурия - наличие глюкозы в моче.

61. Глюконеогенез - синтез глюкозы из неуглеводных веществ, в первую очередь из молочной и пировиноградной кислот.

62. Гормоны - сигнальные молекулы, которые вырабатываются в железах или специализированных клетках внутренней секреции, выделяются в кровь, достигают клеток-мишеней и связываются с мембранными, цитоплазматическими или ядерными рецепторами.

63. Двумерный электрофорез - метод разделения смесей белков в электрическом поле, при котором сперва происходит разделение, основанное на различии изоэлектрических точек их молекул, а затем - на различии молекулярной массы.

64. Денатурация - потеря белком биологической активности из-за нарушения его четвертичной, третичной или вторичной структуры.

Происходит под действием многих факторов – например, при повышении температуры, сильном закислении среды и др.

65. Дисульфидная связь - прочная ковалентная связь, образующаяся при окислении двух сульфгидрильных групп молекул цистеина. Участвует в образовании и стабилизации третичной структуры белка.

66. Диффузия - пассивное перемещение вещества из участка с большей концентрацией к участкам с меньшей концентрацией.

67. ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота, биополимер, состоящий из звеньев - дезоксирибонуклеотидов. ДНК выполняет функцию носителя наследственной информации у всех клеточных организмов. Последовательность нуклеотидов в ДНК определяет последовательность аминокислот в первичной структуре белков организма.

68. ДНК синтез - образование новых молекул ДНК на матрице ДНК родительской клетки.

69. Единицы активности фермента - 1) $E = 1$ мкмоль/мин; 2) катал = 1 моль/с.

70. Железодефицитная анемия - нарушение синтеза гемоглобина вследствие дефицита железа.

71. Желтуха - желтушное окрашивание кожи и слизистых оболочек, обусловленное накоплением в тканях и крови билирубина.

72. Желчнокаменная болезнь - заболевание, при котором в желчном пузыре и желчевыводящих путях образуются камни.

73. Желчные кислоты - производные холановой кислоты, выполняющие роль эмульгаторов. Они также активируют панкреатическую липазу и выполняют роль мицеллообразующего фактора.

74. Жирные кислоты - алифатические одноосновные карбоновые кислоты, входящие в состав жиров; содержат, как правило, неразветвленную

цепь из четного числа атомов углерода (C₄₋₂₄), и могут быть как насыщенными, так и ненасыщенными.

75. Жиры (триглицериды) - сложные эфиры глицерина и жирных кислот, входят в класс липидов. В живых организмах выполняют, энергетическую, защитную, резервную функции.

76. Изолейцин - протеиногенная алифатическая, неполярная, незаменимая α-аминокислота.

77. Изoeлектрическая точка - pI, значение pH, при котором молекула не несёт электрического заряда.

78. Изoeлектрофокусировка - метод разделения смесей белков в электрическом поле, основанный на различии изoeлектрических точек их молекул. В процессе проведения изoeлектрофокусировки создаётся градиент pH, и каждое вещество локализуется в зоне, где pH равен его изoeлектрической точке.

79. Иммуноглобулины (Ig) - глобулярные белки, продуцируются В-лимфоцитами и обладают свойствами антител, т.е. способностью соединяться с антигенами, стимулирующими их образование.

80. Ингибиторы - вещества, тормозящие химические реакции путём снижения активности ферментов.

81. Инсулин - гормон пептидной природы, образуется в β-клетках островков Лангерганса поджелудочной железы. Регулирует обмен веществ. Основное действие инсулина заключается в утилизации глюкозы.

82. Инсулиновый рецептор - трансмембранный белок, внешняя часть которого содержит центр распознавания сигнальной молекулы, а обращённый к цитоплазме фрагмент функционирует как фермент тирозинкиназа, катализирующий аутофосфорилирование.

83. Ионная связь - прочная химическая связь, образующаяся между атомами с большой разностью электроотрицательностей, при которой общая электронная пара полностью переходит к атому с большей электроотрицательностью.

84. Ионообменная хроматография - вариант хроматографии, в котором разделение смеси веществ происходит по заряду их молекул благодаря различной прочности их связывания с заряженными группами на поверхности нерастворимого сорбента.

85. Кальмодулин - Ca^{2+} -связывающий белок.

86. Кальциевые каналы - ионные каналы, избирательно проницаемые для ионов Ca^{2+} .

87. Кальциевый насос (Ca^{2+} -АТФ-аза) - обеспечивает поддержание низкой концентрации Ca^{2+} в цитозоле клетки и создание внутриклеточного депо Ca^{2+} в митохондриях и эндоплазматическом ретикулуме.

88. Кальцитриол - активная форма витамина D, контролирует обмен кальция и

89. Катаболизм - процесс расщепления какого-либо вещества на более простые, обычно протекает с высвобождением энергии (тепло, АТФ).

90. Кератин - белок промежуточных филаментов, содержащийся в эпителиальных клетках. Из кератина состоят волосы, шерсть, рога, копыта. Для кератина характерно наличие α -спирали во вторичной структуре.

91. Ключевой фермент - фермент, который катализирует самую медленную реакцию в метаболическом пути и таким образом определяет скорость всего процесса.

92. Коллаген - фибриллярный белок, составляющий основу соединительной ткани организма (сухожилие, кость, хрящ, дерма и т. п.) и обеспечивающий ее прочность и эластичность. Это основной компонент

соединительной ткани и самый распространенный белок млекопитающих, составляющий от 25 до 35% от суммы всех белков.

93. Коллагеназа - ферментный препарат, получаемый из поджелудочной железы скота; обладает протеолитической активностью преимущественно на коллагеновые волокна; способствует расплавлению рубцов и некротических тканей.

94. Константа равновесия - отношение произведения концентраций продуктов реакции к произведению концентраций субстратов реакции в состоянии равновесия.

95. Конформация - пространственная конфигурация белковой молекулы.

96. Кооперативность - изменение сродства к субстрату у остальных субъединиц ферментов, обладающих четвертичной структурой, после связывания субстрата с первыми субъединицами. Различают положительную кооперативность (увеличение сродства к субстрату) и отрицательную (уменьшение). У ферментов, обладающих кооперативностью, зависимость скорости реакции от концентрации субстрата отличается от уравнения Михаелиса.

97. Кофермент – низкомолекулярное соединение, необходимое для работы определенных ферментов. Часто коферменты синтезируются из витаминов.

98. Кортизол (гидрокортизон) - глюкокортикоидный гормон стероидной природы; секретируется корой надпочечников под воздействием адренокортикотропного гормона (АКТГ); стимулирует глюконеогенез, а также принимает участие в развитии стрессовых и иммунных реакций; благодаря своей липофильной природе легко проникает через клеточную

мембрану в цитоплазму и ядро, где связывается со специфическими рецепторами.

99. Крахмал - смесь резервных полисахаридов растений; состоит из амилозы (30%) и амилопектина (70%), мономером которых является α -глюкоза.

100. Кребса цикл (цикл трикарбоновых кислот) - центральная часть общего пути катаболизма, циклический биохимический аэробный процесс, в ходе которого происходит окисление ацетилКоА до CO_2 и H_2O и освобождается энергия, эквивалентная 12 АТФ.

101. Лактат - конечный продукт гликолиза. В условиях покоя основной источник лактата в плазме - эритроциты. При физической нагрузке лактат выходит из мышц и превращается в печени в глюкозу путём глюконеогенеза.

102. Лактатдегидрогеназа (L-лактат:NAD-оксидоредуктаза; КФ 1.1.1.27) - фермент, катализирующий последнюю реакцию гликолиза, а также обратную реакцию превращения лактата в пируват, при этом образуется NADH^+ и H^+ .

103. Лактоза (молочный сахар) - углевод группы дисахаридов, содержится в молоке и молочных продуктах. Молекула лактозы состоит из остатков молекул глюкозы и галактозы.

104. Лизин - 2,6-диаминокапроновая кислота; протеиногенная, незаменимая, положительно заряженная аминокислота.

105. Липиды - соединения небольшой молекулярной массы, плохо растворимые в воде, но хорошо растворяющиеся в органических растворителях. Содержатся во всех клетках. К липидам относят такие различные соединения, как фосфолипиды, нейтральные жиры, стероиды и

воска. В организме выполняют структурную (входят в состав мембран), энергетическую и регуляторную функции.

106. Липаза - фермент класса гидролаз, катализирует расщепление и синтез сложных эфирных связей в триглицеридах.

107. Липопротеины - сложные белки, транспортные формы липидов в крови; состоят из аполипопротеинов (апо-ЛП) и липидов (жиров, холестерина, фосфолипидов).

108. ЛПНП - липопротеины низкой плотности, комплексы липидов и белков, образующиеся из ЛПОНП после усвоения содержащихся в них нейтральных жиров. Служат для доставки холестерина различным органам и тканям. Высокий уровень ЛПНП повышает вероятность развития атеросклероза.

109. ЛПОНП - липопротеины очень низкой плотности, комплексы липидов и белков диаметром 25–100 нанометров. Образуются в клетках печени из синтезируемых там липидов и белков. Секретируются в кровь, через неё доставляются другим органам и тканям.

110. Макроэрги - вещества, при гидролизе которых выделяется большое количество энергии.

111. Мальтоза - природный дисахарид, состоящий из остатков α -D-глюкозы, соединённых α -гликозидными связями.

112. Метаболизм - обмен веществ, совокупность химических превращений веществ, протекающих в живых организмах.

113. Метаболический путь - последовательность химических превращений в организме определённого вещества.

114. Метгемоглобин - $\text{MtHb} (\text{Fe}^{3+})$ окисленная форма гемоглобина, не связывает кислород.

115. Метионин - протеиногенная незаменимая серосодержащая аминокислота.

116. Микросомальное окисление - детоксикация ксенобиотиков в гладких мембранах эндоплазматического ретикулула путём гидроксилирования монооксигеназами (цитохром P₄₅₀ и B₅).

117. Миоглобин - гемсодержащий хромопротеин, депонирующий кислород в мышечной ткани.

118. Миозин - белок, обеспечивающий вместе с актином мышечное сокращение.

119. Митохондрии - внутриклеточные органеллы, содержащие системы тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования; имеют собственный геном.

120. Моноаминоксидазы - ФАД-содержащие оксидоредуктазы, катализирующие окислительное дезаминирование аминов при участии кислорода с образованием соответствующего альдегида или кислоты, пероксида водорода и аммиака.

121. Мочевая кислота - продукт обмена пуриновых оснований, синтезируется в печени и частично в кишечнике при участии ксантиноксидазы, выделяется с мочой.

122. Мочевина - конечный продукт обезвреживания аммиака, синтезируется в орнитиновом цикле преимущественно в митохондриях печени, выводится с мочой.

123. Натрийуретический фактор - усиливает выведение из организма натрия.

124. Нейромедиаторы - биологически активные химические вещества, посредством которых осуществляется передача нервного импульса в синапсах.

125. Нейтральные жиры - класс соединений из группы липидов, представляющие собой сложные эфиры глицерина и трёх жирных кислот. Нейтральные жиры гидрофобнее фосфолипидов, они накапливаются в клетках в виде нерастворимых жировых включений и несут функцию запасаения питательных веществ.

126. Нуклеотид - мономер, из которого строятся нуклеиновые кислоты. В состав нуклеотида входят остаток сахара (дезоксирибозы или рибозы), азотистое основание, и остаток фосфорной кислоты. Из азотистых оснований в них содержатся аденин, гуанин, цитозин (и в дезоксирибонуклеотидах, и в рибонуклеотидах), а также тимин (только в дезоксирибонуклеотидах) или урацил (только в рибонуклеотидах).

127. Ограниченный протеолиз - один из механизмов регуляции активности ферментов, при котором происходит отрезание части белковой структуры, что ведёт к превращению неактивного предшественника в активный зрелый фермент.

128. Пептидная связь - вид амидной связи, возникающей при образовании белков и пептидов в результате взаимодействия α -аминогруппы ($-\text{NH}_2$) одной аминокислоты с α -карбоксильной группой ($-\text{COOH}$) другой аминокислоты.

129. Первичная структура белка - последовательность аминокислот, составляющая полипептидную цепь.

130. Пиримидиновые нуклеотиды - состоят из азотистых оснований: цитозина, урацила или тимина, углевода: рибозы или дезоксирибозы и остатка фосфорной кислоты; входят в состав ДНК или РНК.

131. Пируватдегидрогеназный комплекс - содержится в матриксе митохондрий, состоит из трёх ферментов и пяти коферментов, осуществляет

окислительное декарбоксилирование пирувата - этап аэробного окисления глюкозы; продуктами процесса являются ацетил-КоА, CO_2 и НАДН и H^+ .

132. Подагра - заболевание, которое характеризуется отложением в различных тканях организма кристаллов солей мочевой кислоты (уратов); в основе лежит накопление мочевой кислоты в крови (гиперурикемия).

133. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) - способ молекулярной диагностики, при котором используется увеличения малых концентраций фрагментов ДНК в биологическом материале.

134. Полисахариды - класс соединений из группы углеводов, биологические полимеры, состоящие из мономеров - моносахаридов. К полисахаридам относятся крахмал, гликоген, целлюлоза, хитин и др.

135. Порфобилиноген - пигмент, присутствующий в моче больных острой порфирией; вызывает ее потемнение даже при непродолжительном стоянии.

136. Постабсорбтивное состояние - период после завершения пищеварения до следующего приёма пищи.

137. Потенциал покоя - разность потенциалов между наружной и внутренней сторонами мембраны невозбуждённой клетки.

138. Прионы - инфекционные белки, при заражении которыми возникают медленно развивающиеся необратимые поражения головного мозга. Прион имеет ту же последовательность аминокислот, что и соответствующий нормальный клеточный белок, но отличается от него пространственной структурой. Прион обладает способностью сообщать нормальному белку в клетке свою злокачественную конформацию.

139. Пролин (пирролидин- α -карбоновая кислота) - протеиногенная гетероциклическая иминокислота.

140. Простагландины - группа физиологически активных веществ, образующихся из арахидоновой кислоты; являются высокоспецифичными внутриклеточными регуляторами функций, обладают выраженным физиологическим эффектом.

141. Простетическая группа - небелковый компонент, связанный с белком, который выполняет важную роль в биологической активности соответствующего белка. Простетические группы могут быть органическими (витамины, углеводы, липиды) или неорганическими (например, ионы металлов).

142. Протромбин - белок плазмы крови человека и животных, гликопротеид, компонент системы свёртывания крови, предшественник фермента тромбина, стимулирующего формирование тромба.

143. РНК - рибонуклеиновая кислота, биополимер, состоящий из звеньев-рибонуклеотидов. В клетке имеется три разновидности РНК: матричная, рибосомальная и транспортная.

144. РНК-полимераза - фермент, осуществляющий транскрипцию РНК. У прокариот имеется одна разновидность РНК-полимеразы, у эукариот - три (для синтеза рРНК, мРНК и тРНК).

145. Стероиды - класс соединений из группы липидов, представляющие собой производные холестерина. К стероидам относятся гормоны медленного стресса глюкокортикоиды (кортизол, гидрокортизон); минералокортикоиды (альдостерон), уменьшающие выведение почками воды и ионов натрия из организма; половые гормоны (андрогены, эстрогены и прогестины).

146. Сульфаниламиды - антибактериальные лекарственные препараты, структурные аналоги ПАБК, конкурентно ингибирующие синтез фолата.

147. Сфингозин - двухатомный непредельный аминспирт, входящий в состав сфинголипидов; ингибитор превращения протромбина в тромбин.

148. Таурин - аминокислота, образующаяся из цистеина, входит в состав парных желчных кислот.

149. Транскрипция - синтез РНК на матрице ДНК в соответствии с принципом комплементарности.

150. Третичная структура белка - пространственная укладка одной полипептидной цепочки, стабилизируемая гидрофобными, ионными, водородными и дисульфидными связями.

151. Фенилкетонурия - наследственная олигофрения вследствие недостаточности фенилаланингидроксилазы.

152. Фермент - биологический катализатор. Почти все ферменты - белки, лишь очень небольшое число реакций в клетке катализируется РНК (некоторые биохимики предлагают называть ферментами только белковые катализаторы). Ферменты характеризуются высокой активностью, высокой специфичностью, способностью к денатурации при высоких температурах, некоторые - способностью регулироваться.

153. Ферритин - железосодержащий белок печени и других тканей, служит резервом железа в организме.

154. Фолиевая кислота - водорастворимый витамин, входящий в состав кофермента тетрагидрофолата, который участвует в синтезе пуриновых и пиримидиновых азотистых оснований; её недостаточность - причина анемии.

155. Фосфолипиды - бифильные вещества, в состав которых входят: глицерин или сфингозин, высшие жирные кислоты, остаток фосфорной кислоты и азотсодержащий спирт (этаноламин, холин, серин) или инозитол.

156. Фруктоза - моносахарид, гексоза, кетоза; входит в состав сахарозы, в свободном виде содержится в мёде.

157. Хиломикроны - комплексы липидов и белков диаметром 0,1-1 мкм. Они образуются в клетках тонкого кишечника из всасывающихся жирных кислот и глицерина пищи, а также из синтезируемых в самих клетках белков. Секретируется в лимфу, из которой поступают в кровоток, а затем усваиваются другими клетками организма.

158. Холестерол - (устаревшее название холестерин), производное гонана, синтезируется в печени из ацетил-КоА, является компонентом биологических мембран, идёт на синтез желчных кислот, витамина Д₃ и стероидных гормонов.

159. Хроматография - метод разделения смесей различных веществ в растворе, основанный на их различном сродстве к нерастворимому сорбенту.

160. Цикл Кребса - процесс окисления остатка уксусной кислоты в форме ацетил-КоА до CO₂ и H₂O. В ходе окисления одного остатка восстанавливаются 3 молекулы НАД⁺ и 1 молекула ФАД, которые затем поступают в дыхательную цепь как субстраты окислительного фосфорилирования, приводящего к синтезу АТФ. У эукариот протекает в митохондриях.

161. Цинга - болезнь, вызываемая острым недостатком витамина С (L-аскорбиновой кислоты).

162. Цистеин (α -амино- β -тиопропионовая кислота) - протеиногенная алифатическая, полярная, серосодержащая аминокислота.

163. Четвертичная структура белка - ассоциация отдельных белковых субъединиц. Для неё характерен кооперативный эффект и специализация субъединиц.

164. Электрофорез - метод разделения смесей различных веществ в электрическом поле, основанный на различной скорости движения молекул с разным зарядом и разной массой.

165. Электрохимический потенциал - градиент ионов H^+ на внутренней мембране митохондрий, на мембранах тилакоидов, а также на наружной мембране бактериальных клеток. Образуется благодаря выкачиванию этих ионов из матрикса митохондрий, стромы хлоропластов или цитоплазмы бактерий. У аэробных гетеротрофов получается за счёт энергии окисления различных веществ ферментами дыхательной цепи, у фотосинтетиков - за счёт энергии света. Энергия электрохимического потенциала используется для синтеза АТФ, активного транспорта ионов через мембрану, у бактерий ещё и для движения.

166. Эмульгирование жиров - образование мелкодисперсной стойкой эмульсии частиц жира в водной среде с помощью поверхностно активных веществ, роль которых в кишечнике выполняют желчные кислоты, образующиеся в печени.

167. Эндонуклеазы - ферменты класса гидролаз, расщепляющие внутренние фосфодиэфирные связи в полинуклеотидной цепи.

168. Эндопептидазы - протеолитические ферменты (пепсин, трипсин, химотрипсин), расщепляющие пептидные связи внутри пептидной цепи.

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белясова Н. А. Биохимия и молекулярная биология: учеб. пособие / Н. А. Белясова. — Минск: Книжный Дом, 2004. — 416 с.
2. Биохимия / Е. С. Северина. — М.: ГЭОТАР-Медиа, Учебник. 2019.
3. Биохимия с упражнениями и задачами / А.И. Глухова, Е.С. Северин. Учебник. 2017
4. Биохимия: задачи и упражнения (для самостоятельной работы студентов) / А. С. Коничев, Т. А. Егорова, Г. А. Севастьянова и др.; под ред. А. С. Коничева. — М.: Колос, 2007. — 140 с.
5. Жеребцов Н.А. Биохимия: учебник для вузов / Н. А. Жеребцов, Т. Н. Попова, В. Г. Артюхов. — Воронеж: Изд-во Воронеж. гос. ун-та, 2002. — 696 с.
6. Кольман Я. Наглядная биохимия / Я. Кольман, К.-Г. Рем. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний; Мир, 2009. — 469 с.
7. Комов В. П. Биохимия / В. П. Комов, В. Н. Шведова. — М.: Дрофа, 2004. — 640 с.
8. Ленинджер А. Биохимия / А. Ленинджер. — М.: Мир, 1974. — 957 с.
9. Мусил Я. Современная биохимия в схемах / Я. Мусил, О. Новакова, К. Кунц. — М.: Мир, 1984. — 216 с.
10. Сабирова Р.А., Юлдашев Н.М. Биохимия. Учебник. -Ташкент. Ijod-print. 2020 г.
11. Спирин А.С. Молекулярная биология. Рибосомы и биосинтез белка / А.С. Спирин. — М.: Академия, 2011. — 496 с.
12. Филиппович Ю.Б. Основы биохимии: учебник для вузов / Ю. Б. Филиппович. — М.; СПб: Агар; Флинта; Лань, 1999. — 512 с.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Баранов Н.П. Биохимия белков и нуклеиновых кислот: учеб. - метод. пособие / Н.П. Баранов, Ю.А. Старых. — Сургут: Изд-во Сургут. гос. ун-та, 2002. — 88 с.
2. Биохимия и молекулярная биология: учеб. пособие / Ю.П. Фролов, М.М. Серых, О.Н. Макурина и др.; под ред. Ю.П. Фролова. — Самара: Изд-во Самар. ун-та, 2004. — 501 с.
3. Варфоломеев С.Д. Химическая энзимология / С.Д. Варфоломеев. — М.: Академия, 2005. — 480 с.
4. Кнорре Д.Г. Биологическая химия / Д.Г. Кнорре, С.Д. Мызина. — М.: Высш. шк., 2000. — 479 с.
5. Коницев А.С. Молекулярная биология: учебник для вузов / А.С. Коницев, Г.А. Севастьянова. — М.: Академия, 2005. — 400 с.