



**ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ПРОФЕССИОНАЛЬНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«СЕВЕРО - ОСЕТИНСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ КОЛЛЕДЖ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РСО-АЛАНИЯ**

**Методические разработки практических занятий  
по ПМ 03 «Проведение лабораторных биохимических  
исследований»**

**для студентов  
по специальности 31.02.03 «Лабораторная диагностика»**

**Преподаватель: Худиева Э.М.**

**Владикавказ 2023-2024 г.**

## Содержание

1-4зан.Организация работы биохимической лаборатории. Обмен веществ и энергии ,гормональная регуляция метаболизма в организме человека.

5-7зан.Исследование биохимических изменений при нарушении обмена углеводов.

8-10зан.Особенности проведения контроля качества лабораторных биохимических исследований.

11-14зан. Исследование показателей обмена белков.

15-17зан.Проведение лабораторных биохимических исследований по определению показателей липидного обмена

18-21зан. Проведение лабораторных биохимических исследований по определению показателей водно-минерального обмена, кислотно-основного состояния.

22-26зан.Проведение лабораторных биохимических исследований по определению активности ферментов, проведение коагулологических исследований.

### Пояснительная записка

**Цель и планируемые результаты освоения профессионального модуля**

**В результате изучения профессионального модуля студент должен освоить основной вид деятельности ВД 2 Выполнение клинических лабораторных исследований первой и второй категории сложности и соответствующие ему общие компетенции и профессиональные компетенции:**

#### Перечень общих компетенций

<b>Код</b>	<b>Наименование общих компетенций</b>
<b>ОК 1.</b>	Выбирать способы решения задач профессиональной деятельности применительно к различным контекстам
<b>ОК 2.</b>	Использовать современные средства поиска, анализа и интерпретации информации, и информационные технологии для выполнения задач профессиональной деятельности
<b>ОК 3.</b>	Планировать и реализовывать собственное профессиональное и личностное развитие, предпринимательскую деятельность в профессиональной сфере, использовать знания по финансовой грамотности в различных жизненных ситуациях
<b>ОК 4.</b>	Эффективно взаимодействовать и работать в коллективе и команде
<b>ОК 5.</b>	Осуществлять устную и письменную коммуникацию на государственном языке Российской Федерации с учетом особенностей социального и культурного контекста
<b>ОК 6.</b>	Проявлять гражданско-патриотическую позицию, демонстрировать осознанное поведение на основе традиционных общечеловеческих ценностей, в том числе с учетом гармонизации межнациональных и межрелигиозных отношений, применять стандарты антикоррупционного поведения
<b>ОК 7.</b>	Содействовать сохранению окружающей среды, ресурсосбережению, применять знания об изменении климата, принципы бережливого производства, эффективно действовать в чрезвычайных ситуациях
<b>ОК 8.</b>	Использовать средства физической культуры для сохранения и укрепления здоровья в процессе профессиональной деятельности и поддержания необходимого уровня физической подготовленности
<b>ОК 9.</b>	Пользоваться профессиональной документацией на

	государственном и иностранном языках
--	--------------------------------------

### Перечень профессиональных компетенций

<b>Код</b>	<b>Наименование видов деятельности и профессиональных компетенций</b>
<b>ВД 2</b>	Выполнение клинических лабораторных исследований первой и второй категории сложности
<b>ПК 2.1.</b>	Выполнять процедуры преаналитического (лабораторного) этапа клинических лабораторных исследований первой и второй категории сложности
<b>ПК 2.2.</b>	Выполнять процедуры аналитического этапа клинических лабораторных исследований первой и второй категории сложности
<b>ПК 2.3.</b>	Выполнять процедуры постаналитического этапа клинических лабораторных исследований первой и второй категории сложности

### В результате освоения профессионального модуля студент должен

Владеть навыками	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. приема биоматериала;</li> <li>2. регистрации биоматериала в журнале и (или) в информационной системе;</li> <li>3. маркировке, транспортировке и хранению биоматериала;</li> <li>4. отбраковке биоматериала, не соответствующего установленным требованиям и оформление отбракованных проб;</li> <li>5. подготовке биоматериала к исследованию (пробоподготовка);</li> <li>6. использовании медицинских, лабораторных информационных систем;</li> <li>7. выполнении санитарных норм и правил при работе с потенциально опасным биоматериалом;</li> <li>8. выполнение правил санитарно-противоэпидемического и гигиенического режима в лаборатории;</li> <li>9. определения показателей белкового, липидного, углеводного и минерального обменов, активности ферментов, белков острой фазы, показателей гемостаза, проведение внутрилабораторного контроля</li> </ol>
------------------	---

	качества.
Уметь	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.транспортировать биоматериал в соответствии с требованиями нормативных документов;</li> <li>2.осуществлять подготовку биоматериала к исследованию;</li> <li>3.регистрировать биоматериал в журнале и (или) в информационной системе;</li> <li>4.отбраковывать биоматериал, не соответствующий утвержденным требованиям;</li> <li>5.выполнять правила преаналитического этапа (взятие, хранение, подготовка, маркировка, транспортировка, регистрация биоматериала);</li> <li>6.применять на практике санитарные нормы и правила;</li> <li>7.дезинфицировать использованную лабораторную посуду, инструментарий, средства защиты;</li> <li>8.стерилизовать использованную лабораторную посуду, инструментарий, средства защиты;</li> <li>9.регистрировать неполадки в работе используемого оборудования в контрольно-технической документации;</li> <li>10.готовить биологический материал, реактивы, лабораторную посуду, оборудование;</li> <li>11.заполнять и вести медицинскую документацию, в том числе в форме электронного документа;</li> <li>12. подготовить материал к биохимическим и коагулологическим исследованиям;</li> <li>13.определять биохимические анализы крови, мочи, ликвора различными лабораторными методами исследования;</li> <li>14.работать на биохимических анализаторах;</li> <li>15.проводить коагуляционные тесты;</li> <li>16.проводить контроль качества биохимических лабораторных исследований;</li> <li>17.интерпретировать биохимические показатели крови в лабораторном бланке биохимического анализатора;</li> <li>18.проводить количественную оценку результатов исследования путем сравнения полученного</li> </ol>

	<p>результата с калибровочной кривой;  19.проводить предварительные исследования с применением иммунохроматографических экспресс-тестов.</p>
<p>Знать</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.правила и способы получения, консервирования, хранения, транспортировки и обработки биоматериала для лабораторных исследований;</li> <li>2. критерии отбраковки биоматериала;</li> <li>3. санитарные нормы и правила для медицинских организаций;</li> <li>4.принципы стерилизации лабораторной посуды, инструментария, средств защиты;</li> <li>5. методики обеззараживания отработанного биоматериала; задачи, структуру, оборудование, правила работы и технику безопасности ВКДЛ;</li> <li>6. правила взятия образца биологического материала на лабораторные исследования;</li> <li>7. правила работы в медицинских, лабораторных информационных системах;</li> <li>8. особенности подготовки пациента к биохимическим лабораторным исследованиям;</li> <li>9. основные методы и диагностическое значение биохимических исследований крови, мочи, ликвора;</li> <li>10. основы гомеостаза, биохимические механизмы сохранения гомеостаза;</li> <li>11. нормальную физиологию обмена белков, углеводов, липидов, ферментов, гормонов, водно-минерального, кислотно-основного состояния;</li> <li>12. причины и виды патологии обменных процессов;</li> <li>13. основные методы исследования обмена веществ, гормонального профиля, ферментов;</li> <li>14. принципы контроля качества коагулологических исследований;</li> <li>15. контрольные материалы для контроля коагулологических исследований;</li> <li>16. принципы коагуляционных тестов;</li> <li>17. правила оформления медицинской документации, в том</li> </ol>

	числе в форме электронного документа; 18. принципы ведения документации, связанной с поступлением в лабораторию биоматериала.
--	--

Оценка за работу на практическом занятии складывается из оценки следующих видов работы:

- организация рабочего места
- наличие и правильность записей по самоподготовке в рабочей тетради
- выполнение вводного контроля
- ответы на занятии: степень подготовленности, активность при обсуждении и правильность ответов
- выполнение самостоятельной работы: соблюдение правил по ТБ и ТЛР, выполнение исследования в соответствии с рекомендованным алгоритмом, правильность выполнения анализа и выполнение отчета о проделанной работе.

### **Методические указания для преподавателей по этапам занятия.**

№	Название этапа	Краткое описание деятельности		Цель	Время	Оснащение
		преподавателя	студентов			
1	Организация занятия	Отмечает отсутствующих. Уточняет готовность студентов к занятию	Готовят лекционные тетради	Мобилизовать студентов на работу	1 мин	Журнал успеваемости посещаемости и группы
2	Формирование темы и ее обоснование	Сообщает тему, акцентирует внимание на ее значимости	Записывают в тетрадь тему, слушают обоснование	Раскрыть теоретическую значимость темы	2 мин	Тетрадь для лекционных занятий
3	Определение цели занятия	Сообщает цели занятия	Записывают цели занятия	Показать студентам конечный результат	2 мин	Тетрадь для лекционных занятий
4	Сообщение плана занятия	Сообщает план занятия	Записывают план занятия	Конкретизировать	5 мин	Тетрадь для лекционных

				внимание студентов		занятий
5	Изложение нового учебного материала	Излагает новый материал учащимся в соответствии с планом	Записывают новый материал в соответствии с планом	Углубление и расширение знаний студентов по теме	60-70 мин	Тетрадь, таблицы, слайды, мультимедийная установка
6	Закрепление материала	Задаёт вопросы по разделам лекции	Слушают вопросы и отвечают на них	Контроль уровня усвоения нового материала	5 мин	Тетрадь, таблицы
7	Подведение итогов занятия	Подводит итоги занятия, отмечает достижение результатов	Слушают вопросы и отвечают на них	Контроль уровня усвоения нового материала	2 мин	Тетрадь, таблицы
8	Домашнее задание	Называет объем материала для подготовки домашнего задания	Записывают в тетрадь	Подготовка студентов к семинарскому занятию	3 мин	Тетрадь

**Раздел 1. Организация работы биохимической лаборатории. Обмен веществ и энергии, гормональная регуляция метаболизма.**



## **Практическая работа №1-2 Изучение организации биохимической лаборатории. Техника безопасности при работе в КДЛ.Метаболизм.**

*Формируемые профессиональные компетенции:* ПК 2.1.

*Учебные цели* (знать, уметь, владеть навыками):

<b>ЗНАТЬ</b>	<b>УМЕТЬ</b>	<b>ВЛАДЕТЬ НАВЫКАМИ</b>
1-8	1-12	1-8

*Воспитательная цель:* привитие умений и навыков учебной работы и коллективного труда. Формирование целостного миропонимания и современного научного мировоззрения, основанного на признании приоритетов общечеловеческих ценностей: гуманности, милосердия, сострадания, уважения к жизни и здоровью человека .

*Развивающая цель:* формирование навыков самообразования, самореализации личности и развитие речи, мышления, памяти .

Межпредметные связи: ОПД 03 Химия, ОПД 16 Физико-химические методы исследований и техника лабораторных работ, ОПД 02 Анатомия.

### **Вопросы для подготовки к занятию**

1. Значение биохимических методов исследования для диагностики и контроля за лечением больных
2. Принципы и основы тактики биохимических исследований
3. Основные правила проведения биохимического анализа
4. Биологические материалы из организма человека ,которые могут быть подвергнуты клинико-биохимическим исследованиям.
5. Взятие и хранение материала для биохимических исследований
6. Прием и регистрация биоматериала для биохимических исследований
7. Правила работы в биохимической лаборатории
8. Основные правила техники безопасности при работе в лаборатории
9. Перечислить признаки живой материи.
10. Материальные основы живой материи
11. Метаболизм, принципы метаболизма. Этапы метаболизма.
12. Анаболизм и катаболизм.

### **Список понятий для усвоения темы**

Метаболизм,анаболизм,катаболизм,гомеостаз,унификация,конвергенция.

Техника безопасности при работе в биохимической лаборатории

Приступая к работе в биохимической лаборатории, каждый студент должен ознакомиться с правилами техники безопасности и информацией о технике лабораторных работ. Меры охраны труда являются обязательными и соблюдение их необходимо при всех видах работ в лаборатории.

**При работе в лаборатории необходимо соблюдать правила обращения с:**

### **1. Биологическим материалом**

1.1. При работе с биологическим материалом (кровь, моча, слюна, желудочный сок, спинномозговая жидкость, гомогенаты тканей и другие) необходимо соблюдать максимальную аккуратность и осторожность. Работу следует выполнять в перчатках. Это необходимо для исключения передачи различных вирусных, инфекционных болезней (СПИД, сифилис, гепатит и другие).

После выполнения работы тщательно вымыть руки.

### **2. Реактивами**

2.1. На всех склянках с реактивами должны быть этикетки с указанием названия реактива и его концентрации. Склянки плотно закупорены.

2.2. Следует соблюдать особую осторожность при обращении с ядовитыми, огнеопасными веществами, с концентрированными кислотами и щелочами. Работать с такими реагентами следует под включенной вытяжкой.

2.3. Реактивы необходимо предохранять от загрязнения.

2.4. Реактивы следует расходовать экономно.

2.5. Недопустимо набирать реагенты в мерные пипетки ртом.

### **3. Электрическими приборами**

3.1. Измерительные приборы (фотоэлектроколориметры, спектрофотометры и другие) должны быть заземлены, технически исправны.

3.2. Водяные термостаты, сухожаровые шкафы, центрифуги должны быть в рабочем состоянии, заземлены. Крышки этих аппаратов во время работы прибора должны быть закрыты.

3.3. Необходимо следить за тем, чтобы в водяном термостате всегда была вода.

### **4. Центрифугами в лабораторном практикуме**

4.1. В центрифугу помещают парное (четное) количество уравновешенных пробирок

4.2. Ось симметрии между двумя пробирками должна проходить через центр ротора

4.3. Проверяют, чтобы центрифужная камера была закрыта крышкой

4.4. Устанавливают необходимую скорость вращения ротора центрифуги

4.5. Включают центрифугу и наблюдают за ее работой в течение всего времени центрифугирования

4.6. Во время работы центрифуги запрещается открывать крышку камеры

4.7. После отключения центрифуги необходимо дать возможность ротору остановиться, запрещается тормозить ротор рукой

4.8. После остановки ротора центрифуги достаньте пробирки из ячеек ротора и продолжите работу на своем рабочем месте

### **5. Газовыми и другими нагревательными приборами**

5.1. Нельзя нагревать посуду из простого химического стекла на открытом пламени

5.2. Посуда с нагреваемым содержимым должна быть закреплена специальным держателем над нагреваемой поверхностью

5.3. Огнеопасные вещества нельзя нагревать на открытом пламени, а только на водяной бане

5.4. При работе с водяной баней необходимо следить за тем, чтобы в ней всегда была вода.

### **6. Водопроводом**

6.1. При использовании водопровода по окончании работы в лаборатории всегда необходимо проверять, выключены ли краны холодной и горячей воды

### **7. Химической посудой и вспомогательными приспособлениями для выполнения методик**

7.1. Стеклоянная химическая посуда (пробирки, пипетки, колбочки, мерные цилиндры и др.) требуют осторожного обращения. В противном случае она может разбиться и травмировать осколками стекла работающего и окружающих

7.2. Автоматические пипетки должны находится в штативах-подставках. Пластик, из которого они сделаны, достаточно хрупкий, при неосторожном обращении, ударах эти точные измерительные приборы могут быть выведены из строя.

## **Взятие, хранение и доставка в лабораторию биологического материала**

Наиболее распространенным материалом для клиничко-лабораторных исследований является кровь, моча и некоторые другие биологические жидкости.

Кровь рекомендуется брать утром (между 8 и 10 часами), до физической нагрузки и проведения диагностических процедур. За сутки до взятия крови прием пищи может быть обычным (следует исключить употребление алкоголя). Практически здоровым лицам и амбулаторным больным накануне утра (после 2ч ночи) запрещается курение, прием пищи и жидкости (разрешается выпивать стакан воды между 22 и 5 часами). Если для выполнения подавляющего большинства тестов взятие крови производят

после 8-12ч голодания, то для определения триацилглицеринов, холестерина требуется выдержать 12-14 часовой интервал после приема пищи. Непосредственно перед взятием крови пациенту необходимо предоставить отдых в положении сидя в течение не менее 15-30 минут (в процессе взятия крови рука пациента располагается под углом 45°). у больных, которым предписан строгий постельный режим, взятие крови осуществляется между 7 и 9 часами, при этом рука пациента, лежащего в постели, должна быть в горизонтальном положении.

Следует иметь в виду, что при пребывании человека в течение нескольких часов в горизонтальном положении объемы плазмы в русле крови оказываются на 10-15% больше, чем у пациента, сохраняющего обычный двигательный режим. Отсюда, концентрация веществ в крови человека, лежавшего более часа, всегда ниже, чем у него же после хотьбы.

Положение тела оказывает влияние на концентрацию общего белка, альбумина, креатина, холестерина, триацилглицеринов, активность щелочной фосфатазы, аспаратаминотрансферазы и других компонентов плазмы. Содержание этих веществ и активность ферментов значительно повышаются при переходе больного в вертикальное положение и, наоборот, уменьшается – в горизонтальном. Максимальное изменение характерно для уровня общего белка, активности ферментов (11%) и содержание кальция (3-4%).

При взятии крови путем венепункции время сдавления сосудов жгутом по возможности должно быть минимальным. Больному не следует сжимать и разжимать пальцы руки, поскольку это вызывает местный стаз и гипоксию, а также сдвиги в распределении некоторых веществ (холестерина, калия, натрия, кальция и др.) между форменными элементами крови и ее жидкой частью.

Во избежание гемолиза кровь следует брать сухим шприцем, сухой иглой (одноразового пользования), в сухую пробирку в стерильных условиях. Если набранная в шприц кровь переносится в пробирку, то эту процедуру осуществляют медленно (для предотвращения вспенивания крови). При исследовании системы гемостаза к процессу взятия крови предъявляют ряд дополнительных требований. Так, рекомендуется использовать иглу с широким просветом, лучше без шприца (его применяют для взятия крови у детей, у взрослых больных с явлениями гипотензии, а также находящихся в терминальном состоянии). Дезинфекцию кожи осуществляют обработкой соответствующего ее участка над местом прокола (обычно в локтевом сгибе) 70% этиловым спиртом. Поскольку при проколе кожи в просвет иглы перемещаются тканевая жидкость и фрагменты тканей, могущие в дальнейшем существенно повлиять на коагулологические тесты, первые (после наложения жгута и прокола вены иглой) 0,5-1 мл (особенно выступившие вначале 5-6 капель) вытекающей крови нельзя использовать для коагулограммы. Однако эту порцию крови можно применять для всех других

биохимических исследований. Чтобы исключить влияние на коагуляцию последствий венозного застоя крови, рекомендуют в процессе ее взятия на непродолжительное время (2-3 сек) расслабить жгут. Кровь должна стекать по стенке пробирки. Если требуется получить плазму, применяют вакутейнеры, обработанные антикоагулянтами (лимоннокислый натрий, щавелевокислый натрий или калий и др.). кровь осторожно перемешивают (без вспенивания), оставляют в штативе на 20-25 мин. Интенсивное встряхивание вызывает гемолиз эритроцитов, что искажает многие параметры коагулограммы. Поэтому плазма с признаками гемолиза не пригодна для данного исследования. При лизисе сосредоточенных в сгустке эритроцитов находящиеся в них ферменты переходят в сыворотку крови. Этим объясняется, в частности, более высокая активность энзимов (лактатдегидрогеназы, аланин – аспартатаминотрансферазы, фруктозо-1,6-дифосфата альдозазы, кислой фосфатазы, аргиназы, фосфогексоизомеразы и других ферментов, содержащихся в значительных количествах в тромбоцитах и эритроцитах и освобождающихся из них при свертывании крови) в сыворотке, чем в плазме крови. Поэтому для оценки активности перечисленных ферментов рекомендуется пользоваться плазмой.

Для получения сыворотки антикоагулянт не добавляют. Доставленные в лабораторию пробирки помещают на 10-15 минут в термостат для прогревания при температуре 37°C. Затем осторожно проводят проволокой или стеклянной палочкой по внутренней стенке пробирки, чтобы ускорить получение сыворотки, и центрифугируют. Пробирку с кровью допускается выдерживать при комнатной температуре (20-26°C) в течение 1-1,5 ч после взятия.

Если сыворотку требуется получить немедленно, то кровь центрифугируют 15 минут при 1500 оборотов/минуту сразу же после ее взятия. Считается, что объем выделяемой сыворотки, составляет примерно 1/3 взятого объема крови (при некоторых патологических состояниях сыворотки получается намного меньше). Сыворотку (дефибринированную плазму) желательно использовать для лабораторных исследований в день взятия крови. Если же исследование откладывают до следующего дня, пробирку с сывороткой закрывают пробкой и помещают в домашний рефрижиратор, в котором хранят при температуре 4°C.

Биохимические исследования выполняются как с плазмой, так и с сывороткой крови. Основным биологическим материалом для исследования активности ферментов и метаболитов является сыворотка крови. Необходимо отметить, что вследствие частичного разрушения эритроцитов, сопровождающего переход их содержимого в окружающую жидкость, а также выделения в процессе свертывания крови и ретракции сгустка находящихся в тромбоцитах биологически активных веществ, могущих влиять на ферменты

плазмы крови, в большинстве случаев активность энзимов сыворотки превышает таковую плазму крови.

Содержание электролитов правильнее определять в плазме крови (при соответствующем подборе антикоагулянта). Поскольку концентрация ионов калия в эритроцитах намного превышает уровень этого катиона в плазме крови, они способны выходить из эритроцитов даже через неповрежденную оболочку (чему способствует нарушения в ней метаболических процессов, в частности АТФ-азной активности, функциональной деятельности К-На-насоса). Исходя из этого определять, уровень калия в плазме следует не позднее чем через  $\frac{3}{4}$ -1 ч после взятия крови.

Гемолизированные сыворотку и плазму не рекомендуется использовать для анализа, за исключением редких случаев.

Обычно сыворотку крови содержат в холодильнике при 0-4°C. Допускается ее хранение в течение месяца (и больше) при условии замораживания сразу после получения и однократном размораживании непосредственно перед определением. Вместе с тем известно, что активность щелочной фосфатазы более стабильна при комнатной температуре (не изменяется на протяжении нескольких суток). В случае хранения сыворотки при пониженной температуре (0-4°C) активность этого фермента постепенно повышается, достигая наибольшей выраженности спустя 12-24 ч. Если данные об устойчивости определяемых соединений, в частности об изменении фермента в сыворотке (плазме) крови при хранении, отсутствуют, рекомендуется проводить биохимический анализ тотчас после ее взятия.

Для определения содержания лабильных соединений, активности некоторых ферментов (кислой фосфатазы и др.) необходимо пользоваться свежей или лиофилизированной сывороткой. Сыворотку же, хранившуюся при 0-40 °С, применять с этой целью нельзя.

Исследуемый материал, как правило, сохраняют до окончания выполнения всех анализов, что позволяет в случае необходимости повторить определение.

При хранении мочи в ней, прежде всего, изменяется содержание тех соединений, на которые влияют присутствующие в жидкости бактерии. Поэтому необходимо производить консервацию мочи разработанными для этого способами, к которым относятся:

1. Быстрое замораживание мочи при температуре -20°C. После оттаивания такая моча пригодна для проведения большинства биохимических исследований.

2. Добавление к суточному объему мочи 5 мл раствора тимола в изопропане (100 г/л). Обработанная этим реактивом моча пригодна для выполнения большинства биохимических анализов, за исключением определения эрекции 17-кетостероидов и желчных кислот.

3. Добавление в качестве консерванта соляной кислоты – из расчета 50 мл 10 ммоль/л (380 г/л, 38%) раствора на суточное количество мочи. Приготовленную таким образом мочу обычно используют для определения содержания в ней стероидов и катехоламинов.

Для подкисления используют также борную кислоту из расчета 1,8 г на 100 мл мочи.

Допускается применять ряд других консервантов: жидкость Мюллера (10 г натрия сульфата, 25 г калия бихромата на 100 мл мочи), хлороформную воду (5-7,5 мл хлороформа на 1 л воды) из расчета 20-30 мл на 1 л мочи. При необходимости определения содержания в моче фотолabile веществ (желчные пигменты, порфирины, витамин В<sub>2</sub>, некоторые метаболиты аминокислот) биологический материал следует направлять на лабораторный анализ как можно быстрее, притом в посуде, обернутой светонепроницаемой бумагой.

Чтобы предотвратить развитие в моче микрофлоры, в наибольшей мере сказывающейся на результатах бактериологического анализа, исследование целесообразно выполнять в сроки от 30 минут до 1,5 ч после ее выделения. Если это невозможно, мочу следует подкислить и хранить в холодильнике при 4°C (что позволяет отсрочить проведение исследования на 6 ч после ее сбора).

Выпотные жидкости собирают в чистую сухую колбу, содержащую в качестве антикоагулянта гепарин или лимоннокислый натрий (добавляют из расчета 1 г на 1 л жидкости), и после тщательного размешивания тотчас направляют на исследование.

Для постановки диагноза и дифференциальной диагностики заболеваний в ряде случаев прибегают к биохимическому анализу пунктатов тканей. С этой целью навеску ткани (например, печени) измельчают в соответствующем объеме жидкости, приготавливая из нее гомогенат или экстракт - вытяжку. Для получения гомогенатов используют растворы следующего состава: 0,25 моль/л сахарозы; 0,25 моль/л сахарозы, содержащей 1 ммоль/л ЭДТА; 0,44 моль/л сахарозы; 0,88 моль/л сахарозы; 9 г/л NaCl и др. экстракт готовят с применением раствора KCl в NaCl различной концентрации, буферных растворов, бидистиллированной воды. Обломки субклеточных структур определяют с помощью центрифугирования на сверхскоростных центрифугах при 18000 об/мин в течение 30 минут.

Результаты лабораторных анализов заносят в журнал, отмечая в нем те из них, которые вызывают сомнения.

Биологический материал, взятый у пациента с целью выполнения лабораторного анализа, именуется образцом. Им может быть цельная кровь, плазма, сыворотка, спинномозговая жидкость, моча и т.д. часть образца, используемая для аналитического определения содержащихся в нем компонентов, обозначается как проба.

Правильность получаемых в лаборатории результатов во многом зависит от требуемой подготовки материала к исследованию. При этом важно обращать внимание на стабильность анализируемых компонентов в сыворотке, плазме крови, моче и других биологических жидкостях.

### **Правила безопасности при работе в лаборатории**

Прохождение инструктажа отмечается росписью в лабораторном журнале по технике безопасности.

Во время работы в лаборатории соблюдайте чистоту, порядок и правила техники безопасности, так как беспорядочность, поспешность или неряшливость в работе часто приводят к несчастным случаям с тяжелыми последствиями.

Запрещается в лаборатории пить воду, принимать пищу, курить.

Все химические реактивы следует хранить только в соответствующей посуде с этикетками.

Студентам запрещается приступать к работе, не согласовав плана работы с преподавателем.

По окончании пользования газом, водой и электроприборами немедленно закройте краны, которыми вы пользовались и отключите электроприборы. Уходя из лаборатории, проверьте окончание химических процессов, выключены ли газ, вода и электрический ток на столах, под тягами и затем в наружных шахтах.

Лица, нарушающие правила безопасности, привлекаются администрацией к ответственности.

### **Правила работы с кислотами и горючими веществами**

Разбавление серной кислоты производить приливанием кислоты в воду, а не наоборот, и только в жаростойких и фарфоровых стаканах, так как при этом происходит значительное выделение тепла.

Переливать концентрированные азотную, серную и соляную кислоты можно только при включенной тяге в вытяжном шкафу. Дверцы шкафа должны быть, по возможности, прикрыты.

При работе с концентрированными кислотами необходимо одевать защитные очки, а при работе с дымящей азотной кислотой, кроме очков, надевать длинный резиновый фартук.

Запрещается при работе с этиловым эфиром, спиртом, бензолом, ацетоном, уксусноэтиловым эфиром и др. горючими и легковоспламеняющимися жидкостями (ЛВЖ) проводить нагревание на голом огне, на сетке, вблизи открытого пламени или в открытых сосудах. Следует иметь ввиду, что легколетучие органические жидкости могут



воспламеняться при отсутствии открытого пламени, при падении на сильно нагретую поверхность.

Если кислота случайно пролита, то ее сначала засыпают песком, чтобы он впитал кислоту, затем песок убирают и место, где была пролита кислота, засыпают известью или содой, после этого замывают водой и вытирают досуха. Пролитые концентрированные растворы щелочей также засыпают песком или древесными опилками, после их удаления обрабатывают поверхность слабым раствором уксусной кислоты. Запрещается слив в канализацию кислот и щелочей без предварительной их нейтрализации.

При переноске кислот и щелочей необходимо соблюдать правила:

- переноска кислот одним человеком разрешается в соответствующей стеклянной посуде емкостью не более 5 л в специальных корзинах

- бутылки емкостью 5 л с кислотами и растворами щелочей должны помещаться в корзины, причем свободные промежутки должны быть заполнены соломой или стружками, корзины должны переноситься двумя работниками.

Запрещается ЛВЖ выливать в ведра, банки для мусора во избежание пожара от случайно брошенной спички.

### **Первая помощь в лаборатории при ожогах и отравлениях**

При термических ожогах немедленно делайте неоднократные примочки в месте ожога спиртовым раствором таннина (можно также смачивать раствором  $\text{KMnO}_4$  или  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  и покрывать мазью от ожогов – сульфидиновой эмульсией).

При ожогах кислотами сначала хорошо промойте обожженное место проточной водой, а затем раствором  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

При ожогах едкими щелочами хорошо промойте обожженное место водой, а затем разбавленной уксусной кислотой.

В случае вдыхания хлора или паров брома следует вдыхать пары спирта, а затем выйти на свежий воздух.

Особое внимание при работе в лаборатории должно уделяться защите глаз. В случае попадания в глаза различных химических реагентов нужно немедленно промыть глаза большим количеством воды в течение 3-5 минут, а затем промыть глаза в случае щелочных растворов раствором  $\text{HBr}$ , в случае кислых – раствором  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . После этих мер первой помощи необходимо немедленно обратиться к врачу.

### **Тушение местного пожара и горячей одежды**

При возникновении пожара немедленно выключите газ и электроприборы по всей лаборатории, уберите все горючие вещества подальше от огня, засыпьте песком или накройте войлочным, шерстяным одеялом или асбестом

очаг пожара. Большое пламя тушат при помощи огнетушителя (лучше применять углекислотные).

Если на ком-либо загорится одежда, тушите обливанием водой из душа или немедленно повалите на пол и накройте войлочным одеялом, которое не снимайте до тех пор, пока не погаснет пламя.

В лаборатории используют ртутные термометры. В случае их разбивания ртуть, проникая в щели пола, испаряется, и ее пары могут послужить источником тяжелых отравлений. Поэтому следует добавить следующее положение в инструкцию:

- пролитую ртуть собирают вакуум-пипеткой с ловушкой. Для собирания ртути можно также использовать склянки Тищенко, подключенные к вакуумному насосу, кисточки или пластины из меди. Необходимо обработать загрязненные ртутью поверхности 1%-ным раствором  $KMnO_4$ , подкисленный  $HCl$ .

*Закончив работу, привести рабочее место в порядок.*

Живая система от неживой отличается обменом веществ и энергии. Обмен веществ и энергии называют метаболизмом. Биохимия создает теоретическую базу для изучения медико-биологических и специальных дисциплин: биологии, гигиены, физиологии, генетики, гистологии, микробиологии, патологии внутренних органов и др.

**Метаболизмом** называют совокупность химических процессов, которым подвергаются различные соединения с момента их поступления в организм до момента их выделения из организма. В результате метаболизма организм получает пластические вещества для построения специфических биополимеров клеточных структур и, расщепляя биополимеры, выполнившие свою функцию в организме, получает энергию, необходимую как для биосинтеза, так и для выполнения различных видов работ в клетках (ионные насосы, мышечное сокращение и др.).

Таким образом, в метаболизме различают анаболизм и катаболизм, и по гребню этих процессов, связанных энергией, протекает процесс жизнедеятельности .

**Катаболизм** – процесс расщепления сложных органических макромолекул (белки, жиры, углеводы) до простых конечных продуктов (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O и мочевины). Распад сопровождается выделением свободной энергии (т.е. экзергонические реакции).

**Анаболизм** – это биосинтез из малых молекул (аминокислот, моносахаридов, глицерина, азотистых оснований, жирных кислот) сложных макромолекул. Биосинтез связан с увеличением размеров молекул и усложнением их структуры, поэтому требует затрат энергии, которая освобождается при катаболизме (т.е. эндергонические реакции). Катаболизм и анаболизм протекают в клетке одновременно и тесно связаны между собой. Питание – это составная часть обмена веществ, поскольку основным источником энергии для живых организмов является энергия, запасенная в химических связях компонентов пищи. Проявления жизнедеятельности и синтез веществ, входящих в состав тела, обеспечиваются за счет химической энергии, освобождающейся при распаде (окислении) сложных органических веществ.

В метаболизме выделяют 4 стадии

1. **Переваривание** — происходит в желудочно-кишечном тракте, в ходе которого чужеродные биополимеры лишаются своей тканевой и видовой специфичности, распадаясь до мономеров.
2. **Всасывание** — прохождение мономеров через слизистую желудочно-кишечного тракта во внутреннюю среду организма.
3. **Промежуточный (межуточный) обмен** — ферментативно обусловленные и регулируемые гормонально и аллостерически внутриклеточные процессы синтеза и распада.

#### 4. Выделение конечных продуктов обмена.

**Принципы метаболизма:** унификация и конвергенция.

**Унификация** — постоянное уменьшение числа участников обменных процессов в организме человека: так из многочисленных полимеров в результате 1-го этапа метаболизма — переваривания — образуется лишь 35 участников обмена (метаболитов).

**Конвергенция** — объединение различных метаболических процессов в клетке, характерных для отдельных видов веществ, в единый процесс — терминальное окисление, протекающее в митохондриях клетки, ведущее к образованию энергии для организма и конечных продуктов распада. В клетке одновременно протекает около 2000 химических реакций.

В результате метаболизма в биологические внутренние среды нашего организма поступает большое количество метаболитов, содержание которых у здорового человека варьирует незначительно и составляет **ГОМЕОСТАЗ (постоянство)** внутренних сред организма (кровь, сыворотка, спинномозговая жидкость, моча, пищеварительные соки и др).

Практически любое заболевание начинается с повреждения (нарушения) одной реакции в метаболизме клетки и затем оно распространяется на ткань, орган или целый организм.

Нарушение метаболизма ведет к нарушению гомеостаза в биологических жидкостях организма человека, что сопровождается изменением биохимических показателей.

Медицина — эта та область знаний, для которой трудно переоценить значение биохимии, значение клинико-биохимических методов исследования биологических жидкостей. Достаточно напомнить, что только в крови

человека можно определить современными методами биохимических исследований около 1000 показателей метаболизма.

### **Литература:**

1. Практика лабораторных биохимических исследований: учебное пособие. Пустовалова Л.М. – Ростов н/Д.: Феникс, 2014
2. Теория лабораторных биохимических исследований (основы биохимии): учебное пособие. Пустовалова Л.М. – Ростов н/Д.: Феникс, 2014

## **Задания для самоконтроля**

### **1. Проверочные тесты**

#### **1 вариант**

1. При разбавлении концентрированной серной кислоты следует:
  - а) в воду вливать кислоту
  - б) в кислоту вливать воду
  - в) одновременно в сосуд вливать воду и кислоту
  - г) не имеет значения последовательность действий
2. На результаты анализа могут повлиять следующие факторы внелабораторного характера:
  - а) прием медикаментов
  - б) прием медикаментов и положение тела
  - в) прием медикаментов, положение тела, и используемые методы.
3. Если на руку попала кислота, то после смыва водой, пораженный участок следует промыть:
  - а) 3% раствором  $\text{NaHCO}_3$
  - б) 1% раствором  $\text{KMnO}_4$
  - в) 2% раствором уксусной кислоты
  - г) 2% раствором борной кислоты
4. На воспроизводимость результатов исследований влияет:
  - а) пипетирование
  - б) осаждение
  - в) изменение температуры
  - г) все перечисленное
5. Для дезинфекции резиновых перчаток используют:
  - а) 6% раствор хлорамина и 3% раствор перекиси водорода
  - б) 3% раствор хлорамина и 6% раствор перекиси водорода
  - в) 3% раствор хлорамина и 0,5% раствор моющего средства
  - г) 0,5% раствор моющего средства
6. Обеззараживание перчаток в 3% хлорамине проводят в течении:
  - а) 15 мин

б) 30 мин

в) 60 мин

г) 45 мин

7. Что происходит в процессе катаболизма:

а) распад сложных веществ с затратой энергии

б) распад сложных веществ с образованием энергии

в) синтез сложных органических веществ с затратой энергии

## **2 вариант**

1. остатки крови на инструментах обнаруживают пробами:

а) амидопириновой и азопирамовой

б) фенолфталеиновой и бензидиновой

в) амидопириновой и нингидриновой

г) мурексидной и фенолфталеиновой

2. В нелабораторные факторы, влияющие на результаты исследования:

а) прием медикаментов

б) прием медикаментов и положение тела

в) прием медикаментов, положение тела и прием пищи

г) прием медикаментов, положение тела, прием пищи и используемые

### методы

3. Для обработки кювет измерительной аппаратуры используют:

а) 0,5% раствор моющего средства

б) 3% раствор хлорамина

в) 6% раствор перекиси водорода

г) 6% раствор хлорамина

4. Для обеззараживания остатков крови используют:

а) 6% раствор хлорамина

б) 6% раствор перекиси водорода

в) 70% спирт

г) сухую хлорную известь

5. Если на руку попала кислота, то после смыва водой, пораженный участок следует промыть:

а) 3% раствором  $\text{NaHCO}_3$

б) 1% раствором  $\text{KMnO}_4$

в) 2% раствором уксусной кислоты

г) 2% раствором борной кислоты

6. При разбавлении концентрированной серной кислоты следует:

а) в воду вливать кислоту

б) в кислоту вливать воду

в) одновременно в сосуд вливать воду и кислоту

г) не имеет значения последовательность действий

7. Постоянство внутренней среды организма это:

а) катаболизм

б) метаболизм

в) гомеостаз

7. Совокупность реакций синтеза органических веществ, идущих с затратами энергии это:

а) анаболизм

б) катаболизм

в) метаболизм

### **Практическое занятие № 3-4: Гормоны, клиническое значение.**

#### **Методы определения. Витамины, классификация, роль в организме.**

*Формируемые профессиональные компетенции:* ПК 2.1., 2.2, 2.3.

*Учебные цели* (знать, уметь, владеть навыками):

ЗНАТЬ	УМЕТЬ	ВЛАДЕТЬ НАВЫКАМИ
1-8,11,13	1-13	1-9

*Воспитательная цель:* привитие умений и навыков учебной работы и коллективного труда. Формирование целостного миропонимания и современного научного мировоззрения, основанного на признании приоритетов и общечеловеческих ценностей: гуманности, милосердия, сострадания, уважения к жизни и здоровью человека.

*Развивающая цель:* формирование навыков самообразования, самореализации личности и развитие речи, мышления, памяти.

Межпредметные связи: ОПД 03 Химия, ОПД 16 Физико-химические методы исследований и техника лабораторных работ, ОПД 02 Анатомия.

#### **Вопросы для подготовки к занятию**

1. Основные правила техники безопасности при работе в лаборатории
2. Гормоны: общая характеристика, классификация и свойства.
3. Назовите белковые и пептидные гормоны. Дайте им характеристику.
4. Биологическое действие гормонов передней, промежуточной и задней доли гипофиза.
5. Гормоны щитовидной железы и её гипо- и гиперфункция.
6. Гормоны поджелудочной железы и мозгового вещества надпочечников.
7. Стероидные гормоны (коркового вещества надпочечников и половые гормоны).
8. Методы определения гормонов.

## **Гормоны: общая характеристика классификация и свойства**

Актуальность :Одной из особенностей живых организмов является их способность сохранять постоянство гомеостаза при помощи механизмов саморегуляции, в осуществлении которых одно из главных мест принадлежит гормонам.

Гормоны (от греч. возбуждать) – биологически активные вещества, образующиеся в результате деятельности желез внутренней секреции и принимающие участие в регуляции физиологических функций организма и обмена веществ. Они являются промежуточным звеном между нервной системой и ферментами. Синтезированные в железах гормоны переносятся с током крови к органам-мишеням и там либо повышают каталитическую активность соответствующих ферментов, либо ускоряют их биосинтез.

Вместе с тем существуют тканевые и нейрогормоны, которые, минуя кровяной поток, воздействуют на клетки-мишени расположенные в непосредственной близости от места их синтеза. Гормонпродуцирующие железы локализованы в различных участках организма в условиях жесткой иерархии, обуславливающей контроль одних гормонов за синтезом других.

Наука, изучающая действие гормонов на живые системы, называется **эндокринологией**.

Гормонам присущи общие биологические свойства:

- дистантность действия, т.е. регулируют обмен и функции эффекторных клеток на расстоянии;
- строгая специфичность биологического действия, т.е. один гормон нельзя целиком заменить другим;
- высокая биологическая активность – для проявления эффекта достаточно малого (десятка микрограмм) количества гормона.

### **Классификация:**

1. Анатомическая - основана на месте природного синтеза гормонов.
2. По химической классификации все гормоны можно разделить на 3 группы:
  - Аминокислоты и продукты их превращений: тироксин и родственные гормоны щитовидной железы, катехоламиновые гормоны.
  - Пептиды и белковые гормоны - наиболее представительная группа гормонов.
  - Стероидные гормоны регулируют процессы обмена веществ, роста, размножения и старения, выделяются половыми железами и корковым веществом надпочечников. Поэтому в зависимости от биологического действия делятся на половые и кортикоидные гормоны (кортикостероиды).
3. По механизму передачи сигналов:



- Пептидные гормоны и адреналин. Они не проникают через мембрану, а связываются с рецепторами мембран. Рецепторы – химические белковые структуры клеток-мишеней, содержащие комплементарные участки связывания с гормоном;
- Стероидные гормоны, являясь гидрофобными соединениями, проникают через мембраны и в клетке связываются со своим рецептором.

#### 4. Классификация гормонов по их биологическим функциям:

- Гормоны, регулирующие обмен углеводов, жиров, аминокислот
- Гормоны, регулирующие водно-солевой обмен;
- Гормоны, регулирующие обмен кальция и фосфатов;
- Гормоны, регулирующие репродуктивную функцию;
- Гормоны, регулирующие функции периферических эндокринных желез.

#### 5. По растворимости гормоны делятся на:

- Гидрофильные: имеют пептидную природу или являются производными аминокислот; способны накапливаться в клетках желез; не проникают в клетку; связываются с рецептором, находящимся на мембране; транспортируются в потоке крови без переносчиков.
- Липофильные: секретируются в кровь сразу после синтеза; проникают через мембрану; связываются с внутриклеточными рецепторами; регулируют транскрипцию отдельных генов; транспортируются с белками переносчиками.

### **Гормоны центральных желез**

**Гормоны гипоталамуса:** В нервных клетках гипоталамуса вырабатываются нейрогормоны (релизинг-факторы, от англ. release – освобождение), которые по системе капилляров достигают гипофиза, регулируя секрецию гипофизарных гормонов. По химическому строению гормоны гипоталамуса являются низкомолекулярными пептидами (олигопептиды).

**Гормоны гипофиза:** Синтезируются гормоны белковой и пептидной природы. В зависимости от места синтеза различают гормоны передней, задней и промежуточной долей гипофиза. В передней доле вырабатываются тропные гормоны, которые стимулируют действие других эндокринных желез.

По механизму их синтеза и биологическим функциям делят на 3 группы:

1. Гормон роста, пролактин.
2. Тиреотропин, лютеинизирующий и фолликулостимулирующий гормон.

3. Группа гормонов, образующихся из проопиомеланокортина (ПОМК) синтезируется в передней и промежуточной долях гипофиза и в некоторых других тканях (кишечнике, плаценте).. К гормонам задней доли гипофиза условно относят вазопрессин и окситоцин, синтезируются они в особых нейронах гипоталамуса, оттуда переносятся разными нейронами в заднюю долю и поступают непосредственно в кровь. Основная биологическая функция окситоцина связана со стимуляцией сокращения гладкой мускулатуры матки при родах и сокращения мышечных волокон, расположенных вокруг альвеол молочных желез, вызывающего секрецию молока. Вазопрессин стимулирует и регулирует минеральный обмен и баланс жидкости

### **Гормоны периферических эндокринных желез**

**Гормоны поджелудочной железы.** Относится к железам со смешанной (внешней и внутренней) секрецией, выделяющая поджелудочный (панкреатический) сок и гормоны. В островках поджелудочной железы образуются: глюкагон (источники:  $\alpha$ -клетки), инсулин ( $\beta$ -клетки) и соматостатин ( $\delta$ -клетки), поступающие непосредственно в кровь и регулирующие углеводный и жировой обмен. Инсулин – ответственный за регуляцию метаболизма углеводов, жиров и белков. Стимулирует процессы клеточного дыхания и его сопряжение с фосфорилированием. Глюкагон - гормон вместе с инсулином образует единую систему регуляции глюкозы в организме. Соматостатин тормозит секрецию глюкагона, регулирует освобождение инсулина и гастрин.

**Гормоны щитовидной железы.** Вырабатываются два активных гормона, производные аминокислоты тирозина: тироксин (Т4) и трийодтиронин (Т3). Отмечают 3 основных эффекта гормонов: - регуляция деления и дифференцировки клеток; - регуляция энергетического обмена ; - индукция процессов транскрипции в биосинтезе многих белков.

**Гормоны паращитовидных желез.** Образуется два белковых гормона – кальцитонин (КТ) и паратгормон (ПТГ, паратиреоидный). Они регулируют в организме баланс ионов кальция и неорганического фосфата. ПТГ действует на клетки-мишени по мембраноопосредованному механизму, причем это действие реализуется в почках, костной ткани и кишечнике. Кальцитонин является антагонистом паратгормона и ингибирует резорбцию костной ткани; уменьшает концентрацию кальция в плазме крови; способствует транспорту фосфора из крови в костную ткань; оказывает выраженное действие на почки, подавляя канальцевую реабсорбцию Са и Р.

### **Гормоны надпочечников.**

В надпочечниках различают мозговой и корковый слой. В мозговом слое образуются катехоламины: адреналин, норадреналин и их предшественники (дофамин). Они являются производными ароматической аминокислоты – тирозина: Адреналин участвует в регуляции сердечно-сосудистой системы,

обмена углеводов (гликогенолиза и глюконеогенеза в печени и мышцах). Норадреналин отличается от адреналина более сильным сосудосуживающим и прессорным действием, меньшим стимулирующим влиянием на сокращения сердца, слабым действием на гладкую мускулатуру бронхов и кишечника, слабым влиянием на обмен веществ.

В корковой части эндокринной железы из холестерина образуются **две группы стероидных гормонов:**

**1. Кортикоиды** – Делят на две группы:

а. Глюкокортикоиды (кортизол, кортикостерон) контролируют многие стороны обмена углеводов, липидов и нуклеиновых кислот. кортикостерон  
кортизол

б. Минералокортикоиды участвуют в регуляции водного и солевого обмена (альдостерон):

**2. Половые гормоны** – от них зависит развитие специфических мужских и женских половых признаков и нормальное функционирование органов размножения. Относят женские гормоны (гестагены и эстрогены) и мужские (андрогены).

### **Методы определения гормонов.**

Практически все гормоны определяют с помощью сложных методов на основе иммуноферментных технологий с использованием автоматических и полуавтоматических анализаторов.

### **МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГОРМОНОВ**

1. Колориметрические методы, основанные на способности гормонов образовывать окрашенные соединения и измерении интенсивности поглощения света на спектрофотометре.

2. Флуориметрический метод, основанный на превращении гормонов во флюоресцирующие продукты и измерении интенсивности флюоресценции.

3. Хроматографический метод (тонкослойная бумажная хроматография, хроматография на ионообменных смолах), основанный на распределении гормонов на различных носителях с последующей их идентификацией.

4. Электрофоретический метод, основанный на распределении гормонов под влиянием внешнего электрического поля и их проявлении.

5. Радиоиммунологический метод, разработанный лауреатом Нобелевской премии Розалиндой Ялоу. Отличается не только высокой специфичностью, но и высокой чувствительностью.

Указанные методы требуют специальной аппаратуры. На практических занятиях студенты знакомятся с качественными реакциями на гормоны.

### **Лабораторная работа 1**

Качественные реакции определения инсулина.

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

Реактивы 1) 10% и 30% растворы NaOH,

2) 1% раствор CuSO<sub>4</sub>,

3) реактив Фоля, содержащий 5% раствор (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Pb и 30% раствор NaOH,

4) концентрированная HNO<sub>3</sub>,

5) раствор натрия нитропруссид,

6) реактив Миллона – раствор нитратов ртути (I) и (II) в HNO<sub>3</sub> с примесью HNO<sub>2</sub>

7) раствор нингидрина

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

**БИУРЕТОВАЯ РЕАКЦИЯ.** В пробирку с раствором инсулина вносят 3 капли 10% NaOH и 1 каплю CuSO<sub>4</sub>.

**НИНГИДРИНОВАЯ РЕАКЦИЯ** Раствор инсулина смешивают с 5 каплями раствора нингидрина. Пробирки нагревают и кипятят 1 минуту. Отмечают появление сине-фиолетового окрашивания.

**КСАНТОПРОТЕИНОВАЯ РЕАКЦИЯ** К раствору инсулина добавляют 2 капли концентрированной азотной кислоты и осторожно нагревают. Наблюдают за появлением желтого окрашивания переходящего при добавлении 30% NaOH в оранжевое.

**РЕАКЦИЯ НА СЕРОСОДЕРЖАЩИЕ АМИНОКИСЛОТЫ** Раствор инсулина и 5 капель 30% раствора NaOH кипятят 1-2 минуты. Разделяют содержимое на 2 части для реакций «а» и «б».

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

**РЕАКЦИЯ С НИТРОПРУССИДОМ** К 5 каплям гидролизата инсулина добавляют 2-3 капли раствора натрия нитропруссид. Отмечают появление краснокоричневого окрашивания.

## Лабораторная работа 2

Качественные реакции определения адреналина.

Реактивы :

1) 10% раствор NaOH,

2) 0,15М раствор FeCl<sub>3</sub>.

**КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ С  $FeCl_3$**  Принцип Раствор  $FeCl_3$ , реагируя с пирокатехиновым кольцом, входящим в молекулу адреналина, образует продукты зеленого цвета.

Материал исследования: раствор адреналина .

Проведение анализа: В пробирку наливают по 10 капель раствора адреналина и добавляют 1 каплю раствора  $FeCl_3$ . Наблюдают зеленое окрашивание. После добавления 1 капли 10% раствора  $NaOH$  окраска переходит в вишнево-красную.

### **Лабораторная работа 3**

Качественная реакция определения тироксина

Реактивы :

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

Материал исследования :Гидролизат тиреоидина, приготовленный на основе таблеток тиреоидина (в ступку помещают 10 таблеток и тщательно растирают, затем к растертой массе в колбу добавляют 20 мл раствора натрия бикарбоната, колбу с обратным холодильником помещают на асбестовую сетку и содержимое колбы кипятят точно 15 мин (с момента закипания) при умеренном нагревании).

**Проведение анализа:** Для обнаружения йода в гидролизате тиреоидина в пробирку наливают 24 капли гидролизата тиреоидина, прибавляют 3 капли раствора крахмала, 1 каплю фенолфталеина, 4 капли  $KJ$  и 10-15 капель раствора серной кислоты до прекращения выделения пузырьков углекислого газа и появления синего окрашивания.

Оформление работы: Записывают принципы методов.

Результаты оформляют в виде таблицы:

Гормон    Химическая природа    Качественная реакция    Результаты

### **Лабораторная работа 4**

Качественные реакции определения фолликулина .

Реактивы:

- 1) 30% раствор  $NaOH$ ,
- 2) 2% раствор м-динитробензола в абсолютном этиловом спирте.

### **КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА 17-КЕТОГРУППУ**

Принцип: 17-кетостероиды, взаимодействуя в щелочной среде с п-динитробензолом, образуют окрашенные продукты конденсации вишнево-красного цвета.

Материал исследования: Спиртовой или масляный раствор фолликулина

**Проведение анализа:** В пробирку вносят 5 капель раствора фолликулина и добавляют по 5 капель раствора NaOH и п-динитробензола. Перемешивают. Развивается вишнево-красное окрашивание.

Оформление работы: Записывают принцип методов.

Результаты оформляют в виде таблицы:

Гормон Химическая природа Качественная реакция Результаты

### **ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ГОРМОНОВ**

Широкий диапазон влияния, способность регулировать основные, определяющие процессы в жизнедеятельности организма, обусловили широкое использование гормонов и гормоноидов в практической медицине не только при заболеваниях, вызванных гормональной недостаточностью (заместительная терапия), но и при заболеваниях, связанных с различными нарушениями обмена веществ различной этиологии. Для лечения этих заболеваний выпускается масса гормональных препаратов и их синтетических аналогов.

### **ЛИТЕРАТУРА.**

1. Практика лабораторных биохимических исследований: учебное пособие. Пустовалова Л.М. – Ростов н/Д.: Феникс, 2014
2. Теория лабораторных биохимических исследований (основы биохимии): учебное пособие. Пустовалова Л.М. – Ростов н/Д.: Феникс, 2014
3. Теория и практика лабораторных биохимических исследований учебник/Н.В.Любимова, И.В.Бабкина, Ю.С.Тимофеев-М.: ГЭОТАР-Медиа, 2020. 416 с.: ил.

### **ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ПО РАЗДЕЛУ «ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ»**

1. СТЕРОИДАМИ ПО ХИМИЧЕСКОЙ ПРИРОДЕ ЯВЛЯЮТСЯ ГОРМОНЫ:
  - 1) норадреналин
  - 2) вазопрессин
  - 3) гастрин
  - 4) эстрон

5) тестостерон  
2. ПРОИЗВОДНЫМИ АМИНОКИСЛОТЫ ТИРОЗИНА ПО ХИМИЧЕСКОЙ ПРИРОДЕ ЯВЛЯЮТСЯ:

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

3. ОСТРОВКОВАЯ ТКАНЬ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРОДУЦИРУЕТ ГОРМОН:

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

4. В РЕГУЛЯЦИИ ОБМЕНА ЭЛЕКТРОЛИТОВ ПРИНИМАЕТ УЧАСТИЕ ГОРМОН:

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

5. В РЕГУЛЯЦИИ ФОСФОРНО-КАЛЬЦИЕВОГО ОБМЕНА УЧАСТВУЮТ ГОРМОНЫ:

- 1) паратгормон
- 2) кальцитонин
- 3) адренокортикотропин
- 4) тестостерон
- 5) прогестерон

6. В РЕГУЛЯЦИИ ВОДНОГО БАЛАНСА И ОСМОТИЧЕСКОГО ДАВЛЕНИЯ ПЛАЗМЫ КРОВИ, А ТАКЖЕ СТИМУЛЯЦИИ СОКРАЩЕНИЯ ГЛАДКИХ МЫШЦ УЧАСТВУЕТ ГОРМОН:

- 1) пролактин
- 2) соматостатин
- 3) кортиколиберин
- 4) вазопрессин

7. ПЕПТИДНЫЕ ГОРМОНЫ СИНТЕЗИРУЮТСЯ:

- 1) в паращитовидной железе
- 2) в поджелудочной железе
- 3) в щитовидной железе
- 4) яичниках

5) в коре надпочечников

8. ГОРМОНЫ СТЕРОИДНОЙ ПРИРОДЫ СИНТЕЗИРУЮТСЯ:

- 1) в щитовидной железе
- 2) в поджелудочной железе
- 3) в семенниках
- 4) в мозговом веществе надпочечников
- 5) в коре надпочечников

9. ФУНКЦИЮ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ РЕГУЛИРУЕТ ГОРМОН:

- 1) тиреолиберин
- 2) кальцитонин
- 3) тиреотропин
- 4) тироксин

10. РАСПАД ГЛИКОГЕНА В ПЕЧЕНИ СТИМУЛИРУЕТ ГОРМОН:

- 1) норадреналин
- 2) глюкагон
- 3) инсулин
- 4) адреналин
- 5) эстрадиол

11. БИОСИНТЕЗ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ В КОРЕ НАДПОЧЕЧНИКОВ СТИМУЛИРУЕТ ГОРМОН:

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

12. ЛИПОЛИЗ В ЖИРОВОЙ ТКАНИ СТИМУЛИРУЕТ ГОРМОН:

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

### **СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ ПО РАЗДЕЛУ «ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ»**

1. Больной жалуется на неутолимую жажду, употребление большого объема жидкости, значительное количество мочи (6-8 л в сутки). При обследовании найдено глюкозы в крови 5,2 ммоль/л, кетоновых тел нет. Моча бесцветная, плотность 1,002, сахара нет. Назовите возможные причины полиурии.

2. Врач обнаружил у больного резкое снижение веса тела, повышенную раздражительность, небольшое повышение температуры по вечерам,



пучеглазие (экзофтальм), повышение общего обмена, увеличение поглощения кислорода, гипергликемию, гиперазотемию. О заболевании какой эндокринной железы можно думать?

4. Может ли переедание и ожирение способствовать развитию сахарного диабета?

5. Человек на улице потерял сознание. В приемном покое больницы отметили слабые судороги, запаха ацетона нет, сахар крови 1,66 ммоль/л, кетоновых тел и сахара в моче нет. Какая может быть причина потери сознания? Какую первую помощь

## **ВИТАМИНЫ**

### **Характеристика и классификация витаминов. Понятие а-, гипо- и гипервитаминозов**

Витамины (от лат. «vita» - жизнь) - низкомолекулярные органические и биокоординационные вещества, присутствие которых необходимо в небольшом количестве в пище человека и животных для их нормальной жизнедеятельности. Витамины являются регуляторами обмена веществ, многие из них - составные части ферментов. В отличие от других пищевых веществ: витамины не включаются в структуру тканей и не используются организмом в качестве источника энергии. Каждый витамин имеет три названия: по наименованию того заболевания, которое развивается при отсутствии данного витамина в пище с приставкой анти-; обозначают буквой латинского алфавита; химическое название. Заболевания, развивающиеся при полном отсутствии витаминов в пище, называется авитаминоз, при недостаточном поступлении - гиповитаминоз, при избыточном - гипервитаминоз.

Причины а- и гиповитаминозов бывают экзогенные и эндогенные .

Классификация: в зависимости от растворимости различают:

1. жирорастворимые
2. водорастворимые витамины.

Помимо главных групп витаминов различают группу витаминоподобных веществ - это разнообразные химические вещества, обладающие

витамиными свойствами. К ним относят: холин, липоевая кислота, витамин В15, инозит, убихинон, парааминобензойная кислота, карнитин, ряд факторов роста и т.д.

### **Жирорастворимые витамины: строение, биологическая роль и источники .**

**Витамин А** (ретинол, антиксерофтальмический) Биологическая роль заключается в его влиянии на барьерную функцию кожи, слизистых оболочек, проницаемость клеточных мембран, биосинтез их компонентов. При недостатке витамина сухость кожи, себоррейный дерматит, повышенная чувствительность зубной эмали (гиперестезия), нарушение структуры покровных тканей и ороговение эпителия. Одним из основных симптомов является ксерофтальмия. К наиболее ранним симптомам относится куриная слепота (гемералопия). Гипервитаминоз - воспаления глаз, мелкие трещины на губах и в уголках рта, сухость и пигментация кожи, выпадение волос, суставные боли, диффузное утолщение костей, общее истощение организма и т.д. Источники: печень к.р.с. и свиней, яичный желток, молоко, сливки, рыбий жир. В растениях витамин содержится в виде своего предшественника - провитамина каротина.

**Витамин D** (кальциферол, антирахитический). Существует в виде нескольких соединений, основе структуры которых лежит конденсированная кольцевая система циклопентанпергидрофенантрена. Витамин участвует в регуляции процессов всасывания Са и Р в кишечнике. Усиливает ДНКзависимый синтез рибонуклеиновой кислоты, реакции 24 окислительного фосфорилирования. Способствует реабсорбции фосфатов, аминокислот, ионов Са из первичной мочи в кровь. При недостатке у детей развивается рахит, у взрослых - остеомалация, Гипервитаминоз приводит к развитию гиперкальциемии, возникают боли в суставах и мышцах, нарушается пищеварение, сердечная деятельность, заболевания почек. Источники: рыбий жир, печень, желток яиц, растительные масла, дрожжи. С профилактической и лечебной целью используется препарат витамина D в сочетании с ультрафиолетовым облучением.

**Витамин Е** (токоферол, антистерильный): С витамином Е связана активность ферментов содержащих серу, клеточное дыхание, необходим для образования креатинина, фосфатидов. В качестве антиоксиданта витамин защищает клетки от повреждения, замедляя окисление жиров и формирование свободных радикалов. Он защищает другие жирорастворимые от разрушения кислородом, способствует усвоению витамина А. Источники: растительные масла, семена злаков (особенно проросшие), мясо, сливочное масло, яичный желток.

**Витамин К** (производные нафтохинона, антигеморрагический). Витамин способствует синтезу протромбина. Дефицит в организме приводит к развитию геморрагического синдрома. Проявляется различными

кровотечениями. Витамин частично синтезируется микрофлорой кишечника. Причинами также являются прием антикоагулянтов, "кроверазжижающих", противосудорожных препаратов, антибиотикотерапия, желудочно-кишечные расстройства и заболевания, сопровождающиеся нарушением всасывания жиров кишечной стенкой. Источники: зеленые части растений: листья крапивы, шпината, капуста, плоды шиповника. В животных продуктах: печень свиньи.

**Витамин F** – это комплекс ненасыщенных жирных кислот. Витамин необходим для синтеза липидов, простогландинов в организме, обладает липотропным действием, способствует выделению холестерина из организма. Гиповитаминоз возникает при недостатке жирных кислот (линолевой, линоленовой, арахидоновой) . При этом развивается сухость и шелушение кожи. Источники витамина: растительные масла, животные жиры и жиры бобовых культур.

### **Водорастворимые витамины: строение, биологическая роль и источники**

**Витамин B1** (тиамин, антиневритный). участвует в углеводном обмене и связанных с ним энергетическом, жировом, белковом, водно-солевом обмене, оказывает регулирующее воздействие на трофику и деятельность нервной системы. При недостатке развивается заболевание «бери-бери». В организме нарушается углеводный обмен, накапливается молочная и ПВК. В зависимости от формы заболевания поражаются периферическая нервная система, сердечно-сосудистая система, атония кишечника.

Источники: дрожжи, хлеб из муки грубого помола, необработанный рис, бобовые (соя, фасоль, горох). Из продуктов животного происхождения – мясо, печень, почки, мозг.

**Витамин B2** (рибофлавин, витамин роста). необходим для дыхания клеток, роста, для образования красных кровяных телец и антител. Недостаток рибофлавина проявляется в остановке роста, воспалении слизистой оболочки языка, губ в уголках рта. Наиболее характерны изменения со стороны глаз - светобоязнь, кератиты, катаракта, развивается общая сердечная и мышечная слабость.

Источники: Витамин распространен в природе, в организм поступает с мясными и молочными продуктами, содержат яйца, дрожжи, хлеб из муки грубого помола, семена злаков, свежие овощи.

**Витамин B3** (пантотеновая кислота, антидерматитный). Название получил от греч. "пантотен", что означает "всюду", из-за широкого распространения в природе. При недостатке развиваются дерматиты, дистрофические изменения желез внутренней секреции (надпочечники) и нервной системы (параличи). Источники: печень, яичный желток, икра рыб, дрожжи, зеленые части растений, пшеничные отруби.

**Витамин В5 (РР)** (никотиновая кислота, никотинамид, антипеллагрический). Входит в состав коферментов НАД и НАДФ, которые являются переносчиками водорода к флавопротеиновым ферментам, тем самым, регулируя окислительно-восстановительные процессы в организме. При недостатке развивается пеллагра (от итал. шершавая кожа), дерматит, чаще всего поражаются участки кожи, подверженные влиянию прямых солнечных лучей. Специфическим являются стоматиты, гингивиты, поражения языка с вздутиями и трещинами, нарушения желудочно-кишечного тракта и нервной деятельности.

Источники: мясо, печень, рыба, яйцо, молоко, хлеб, картофель, морковь, пивные дрожжи, пшеничные отруби, ячмень, рис.

**Витамин В6** (антидерматитный). Объединяет три соединения - пиридоксин, пиридоксаль и пиридоксамин. Витамин необходим для нормального функционирования центральной и периферической нервной системы, участвует в синтезе нейромедиаторов. Недостаточность витамина проявляется в виде дерматитов, поражений нервной системы, эпилептических судорог, угнетается деятельность красного костного мозга. Источники: мясо, рыба, печень трески, почки, сердце, яичный желток, молоко, неочищенные зерна злаковых (гречневая и пшеничная крупы), дрожжи, бобовые, кукуруза, картофель, соя.

**Витамин В12** (кобаламин, антианемический). Имеет сложное химическое строение. Входит в состав коферментов изомераз и трансфераз. Недостаток приводит к развитию гиперхромной, мегалобластической анемии, пернициозной анемии, а также нарушениям катаболизма высших жирных кислот с нечётным содержанием атомов углерода и разветвленных аминокислот, что приводит к их накоплению в мозге и сопровождается нарушением психики.

Источники: печень, почки, говядина, домашняя птица, рыба, яйцо, молоко, морская капуста, соя и соевые продукты, дрожжи, синтезируется микроорганизмами.

**Витамин С** (аскорбиновая кислота, антискорбутный). Обладает сильными окислительно-восстановительными свойствами: Аскорбиновая кислота - необходимый пищевой фактор для человека, обезьян и морских свинок. Все другие животные способны синтезировать витамин С из глюкозы. При недостатке витамина развивается цинга (скорбут). Повышается проницаемость кровеносных сосудов (петехии), кровоточивость десен, расшатывание и выпадение зубов. Общая слабость, одышка, сердцебиение. Источники: цитрусовые фрукты, ягоды (шиповник, смородина, облепиха), овощи (капуста: кочанная, цветная), молоко.

**Витамин Р** (рутин, капилляроукрепляющий). Под термином "витамин Р" объединяют группу веществ со сходной биологической активностью, их общее название - биофлавоноиды. Так же как и витамин С является

антиоксидантом, участвует во многих окислительно-восстановительных реакциях, поэтому существует биохимическая связь между аскорбиновой кислотой и рутином. При отсутствии или недостатке повышается проницаемость сосудов, появляются кровоизлияния.

Источники: распространен в растительном мире, высоким содержанием рутина отличаются листья гречихи.

**Витамин Н** (биотин, антисеборейный). Биотин выполняет коферментную функцию в составе карбоксилаз: он участвует в образовании активной формы  $\text{CO}_2$ . При недостатке развивается себорея. Бактерии кишечника способны синтезировать биотин в достаточном количестве. К снижению синтеза биотина может привести прием сульфаниламидных препаратов и антибиотиков, подавляющих рост микроорганизмов в кишечнике. Источники: богаты пивные дрожжи, печень, почки, молоко, желток, картофель. Много в зерне ячменя, овса, кукурузы.

**Витамин В9** (В9, фолиевая кислота, антианемический). При восстановлении она превращается в активную форму — тетрагидрофолиевую кислоту, которая является коферментом многих ферментов, катализирующих реакции переноса одноуглеродных остатков. Недостаток вызывает нарушения синтеза аминокислот серина, метионина, белков и нуклеиновых кислот, что приводит к нарушениям роста, развитию анемии, лейкопении. Источники: зеленые части растений, листовые овощи, дрожжи, печень, почки, мясо, картофель.

## **Лабораторная работа 1 Качественные реакции на жирорастворимые витамины .**

### **КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА РЕТИНОЛ**

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

- 1) Серная кислота (конц.),
- 2) хлороформ.

Материал исследования Витамин А (0,05% масляной раствор).

**Проведение анализа:** В пробирку вносят 2 капли раствора витамина А, 5 капель хлороформа и 1-2 капли концентрированной серной кислоты. Появляется синее окрашивание, переходящее в фиолетовое, затем в красно-бурое.

### **КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА КАЛЬЦИФЕРОЛ**

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

- 1) Серная кислота (конц.),
- 2) хлороформ.
- 3) уксусный ангидрид.

Материал исследования Витамин D (масляный раствор).

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

### **ОБНАРУЖЕНИЕ ТОКОФЕРОЛА (ВИТАМИН E)**

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

Реактивы :

- 1) Азотная кислота (конц)

Материал исследования :Витамин E (0,1% спиртовой раствор).

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

### **РЕАКЦИЯ НА ВИКАСОЛ (СИНТЕТИЧЕСКИЙ АНАЛОГ ВИТАМИНА K1)**

**Принцип метода:** Викасол в присутствии цистеина в щелочной среде окрашивается в лимонно-желтый цвет.

Реактивы :

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

Материал исследования :Викасол (0,05% раствор).

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

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

**Оформление работы:** Отмечают принцип методов, регистрируют результаты анализа в таблице и делают вывод о наличии витаминов с исследуемым материалом.

Название витамина	Реакция обнаружения	Наблюдаемое окрашивание
-------------------	---------------------	-------------------------

## **Лабораторная работа 2**

### **Качественные реакции на водорастворимые витамины**

## **. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА НИКОТИНОВУЮ КИСЛОТУ**

Принцип: При нагревании витамина РР с раствором уксуснокислой меди образуется плохо растворимый синий осадок медной соли никотиновой кислоты.

Материал исследования: порошок никотинамида.

**Проведение анализа:** 5-10 мг (щепотка) никотиновой кислоты помещают в пробирку с 10 каплями раствора уксусной кислоты и растворяют при нагревании. К нагретому до кипения раствору добавляют равный объем раствора уксуснокислой меди. Жидкость становится мутной. При стоянии и постепенном охлаждении раствора выпадает синий осадок медной соли никотиновой кислоты.

## **КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ПИРИДОКСИН**

Принцип :Витамин В6 с  $FeCl_3$  образует комплексную соль красного цвета типа фенолята железа.

Материал исследования :1% раствор витамина В6.

**Проведение анализа:** К 5 каплям раствора витамина В6 прибавляют равное количество раствора  $FeCl_3$ . Развивается красное окрашивание.

Оформление работы: Отмечают принцип методов, регистрируют результаты анализа в таблице и делают вывод о наличии витаминов с исследуемым материалом.

Название витамина	Реакция обнаружения	Наблюдаемое окрашивание
-------------------	---------------------	-------------------------

### **Вопросы для самоконтроля**

1. Какие вещества называют витаминами?
2. Установите связь ферментов и витаминов
3. Общая характеристика и классификация витаминов. Понятие а-, гипо-, гипервитаминозов.
4. Жирорастворимые витамины (А, Д, Е, К, F). Биологическое значение.
5. Водорастворимые витамины (В1, В2, В3, В5, В6, В12, Вс, С, Н, Р). Биологическое значение. Коферментная функция витаминов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ Основная 1. Березов, Т.Т. Биологическая химия / Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. – М: Медицина. – 2002. – 704 с.

2. Практика лабораторных биохимических исследований: учебное пособие.

Пустовалова Л.М. – Ростов н/Д.: Феникс, 2014

3. Теория лабораторных биохимических исследований (основы биохимии): учебное пособие. Пустовалова Л.М. – Ростов н/Д.: Феникс, 2014

### **ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ПО РАЗДЕЛУ ВИТАМИНЫ**

1.Какие витамины относятся к жирорастворимым?

- а) В6; б) А; в) Е; г) С;  
д) В12; е) К; ж) Н; з) D.

2.Какой витамин является одним из сильных природных антиоксидантов?

- а) А; б) В3; в) D; г) Е; д) К.

3.Какой витамин синтезируется в организме под влиянием ультрафиолетовых лучей?

- а) А;б) Н; в) В12; г) D; д) С.

4.Какие витамины относятся к водорастворимым?

- а) В6;б) А; в) Е; г) С;  
д) В12;е) К; ж) Н; з) D.

5.Какой витамин регулирует в организме процесс свертывания крови?

- а) А; б) В3; в) D; г) Е; д) К.

### **СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ ПО РАЗДЕЛУ «СТРОЕНИЕ, КЛАССИФИКАЦИЯ И РОЛЬ ВИТАМИНОВ»**

1. Недостаточность какого витамина, проявляется развитием ксерофтальмии. Объясните причину?

2. Варфарин – препарат, применяемый для борьбы с грызунами, при его приеме у них возникают сильные кровотечения. Предположите механизм действия варфарина.

3. У больного нарушено переваривание липидов. Недостаточность каких витаминов следует ожидать? Почему?

4. У новорожденного обильные подкожные кровоизлияния, кровь в кале, носовые кровотечения. Недостаточность какого витамина наблюдается?



5. Больной плохо видит в сумерках, слабо ориентируется при переходе от света к темноте. Недостаток какого витамина наблюдается?
- 6.Какая связь существует между анемией и пониженной секрецией желудочного сока?

## **РАЗДЕЛ 2. Исследование биохимических изменений при нарушении обмена углеводов.**

**Практическое занятие №5:Общая характеристика углеводов,классификация,свойства. Выполнение качественных реакций на углеводы. Исследование углеводного состава биологических жидкостей.**

Формируемые профессиональные компетенции: 2.1, 2.2, 2.3.

Учебные цели (знать, уметь, иметь практический опыт):

<b>Знать</b>	<b>Уметь</b>	<b>Владеть навыками</b>
1-8,11,13	1-13	1-9

Воспитательная цель Привитие умений и навыков учебной работы и коллективного труда. Формирование целостного миропонимания и современного научного мировоззрения, основанного на признании приоритетов общечеловеческих ценностей: гуманности, милосердия, сострадания, уважения к жизни и здоровью человека.

Развивающая цель Формирование навыков самообразования, самореализации личности и развитие речи, мышления, памяти

Межпредметные связи ОПД. 03 Химия, ОПД. 16 Физико-химические методы исследования и техника лабораторных работ, ОПД . 02 Анатомия.

## **Вопросы для подготовки к занятию**

1. Основные правила техники безопасности при работе в лаборатории.
2. Строение и классификация углеводов.
3. Свойства и функции углеводов.
4. Суточная потребность в углеводах.

## **Список понятий для усвоения темы**

*Углеводы, моносахариды, олигосахариды, полисахариды, гомополисахариды, гетерополисахариды, альдозы, глюкоза, гликоген, крахмал, гексозы, альдозы, кетозы.*

## **1. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ**

Углеводами называют полиоксиальдегиды и полиоксикетоны, а также полимеры этих соединений. В биосфере углеводов больше, чем всех других органических соединений, вместе взятых. В расчёте на сухое вещество растения содержат 80-90%, животные организмы – 2% углеводов от массы тела. Углеводы являются конечными продуктами реакции фотосинтеза у растений. Животные, не обладая способностью к подобной аккумуляции солнечной энергии, используют вещества, накапливающиеся в растениях.

### *Классификация углеводов*

I Моносахариды (не способны гидролизаться без потери углеводных свойств)

II Олигосахариды гидролизуются с образованием небольшого числа моносахаридов (от 2 до 10)

III Полисахариды при гидролизе образуют большое число моносахаридов (десятки и сотни)

Моносахариды. По содержанию альдегидной или кетонной группы моносахариды делят на альдозы и кетозы. По числу углеродных атомов различают триозы (три атома углерода), тетразы (четыре атома углерода), пентозы, гексозы, гептозы и т.д. Всем моносахаридам присуща стереоизомерия. В живых организмах преобладают D- формы углеводов. Исключения: L- арабиноза, L- моносахариды у бактерий. Триозы в свободном виде в организме практически не встречаются. Фосфорные эфиры триоз (3- фосфоглицериновый альдегид и диоксиацетонфосфат) являются промежуточными веществами в обмене углеводов. Пентозы:  $\beta$ - D- рибоза входит в состав нуклеотидов. Нуклеотиды – компоненты РНК, АТФ и некоторых ферментов. 2- дезокси –D- рибоза – составная часть ДНК. D- ксилоза входит в состав полисахаридов клеточных стенок растений.

Гексозы. Альдогексозы:  $\alpha$  – D- глюкопираноза ( $\alpha$ -глюкоза) входит в состав крахмала, сахарозы. В свободном виде присутствует во фруктовых соках (виноградный сахар), в плазме крови человека и животных. ( $\beta$ - глюкоза) входит в состав целлюлозы.  $\beta$  – D- галактопираноза составная часть молочного сахара (лактозы).

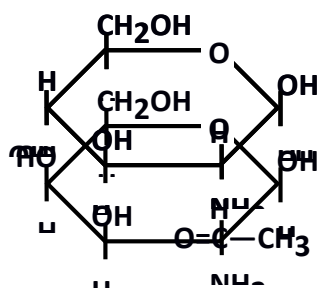
Кетогексоза  $\beta$  – D- фруктофураноза в свободной форме содержится о фруктовых соках и мёде, в связанной форме в сахарозе и полисахаридах (например, в инулине).

#### Производные моносахаридов

1) фосфорные эфиры являются промежуточными веществами в обмене углеводов.

2) уроновые кислоты. Глюкуроновая кислота входит в состав полисахаридов, участвует в обезвреживании токсичных продуктов обмена белков в печени. Галактуриновая кислота служит структурным блоком некоторых полисахаридов.

3) аминосахара входят в состав полисахаридов и гликопротеинов.



—  
|  
|

Дисахариды. При образовании гликозидной связи между полуацетальным гидроксильным группом одного моносахарида и ОН- группой другого моносахарида получается дисахарид. Если у второго моносахарида в образовании связи участвует спиртовой гидроксил, а полуацетальный гидроксил остаётся свободным, дисахарид будет восстанавливающим (есть возможность для раскрытия цикла и образования альдегидной группы, обладающей восстанавливающими свойствами; такой дисахарид будет восстанавливать реактив Фелинга, серебро из оксида и т.п.)

Мальтоза,  $\alpha$  – D- глюкопиранозил-(1→4) – D- глюкопираноза. Образуется при гидролизе крахмала под действием амилаз солода. Восстанавливающий дисахарид.

Целлобиоза,  $\beta$ – D- глюкопиранозил — (1→4) — D- глюкопираноза. Промежуточный продукт при гидролизе клетчатки в рубце жвачных под действием ферментов микрофлоры рубца. Восстанавливающий дисахарид.

Лактоза,  $\beta$ – D- галактопиранозил — (1→4) — D- глюкопираноза – углеводный компонент молока млекопитающих. В коровьем молоке содержится до 4,5% лактозы, в женском молоке – до 7,5%. Это восстанавливающий дисахарид.

Сахароза,  $\alpha$ – D- глюкопиранозил — (1→2) —  $\beta$ – D- фруктофуранозид, относится к невосстанавливающим дисахаридам. Служит растворимым резервным сахаридом и транспортной формой, которая легко переносится по растению. Высоко содержание сахарозы в сахарной свекле и сахарном тростнике. Мёд образуется при ферментативном гидролизе цветочного нектара в пищеварительном тракте пчелы и содержит инвертный сахар — равные количества глюкозы и фруктозы.

Полисахариды. Гомополисахариды (гомогликаны) – полисахариды, построенные из моносахаридных звеньев одного типа.

Крахмал — резервный полисахарид растений. Для человека и животных является важным углеводным компонентом пищевого рациона. Крахмал

состоит из двух фракций: амилозы (рис. 1) и амилопектина. В зависимости от вида растения на амилозу приходится 10-30 %, на амилопектин 70-90%.

Гликоген — резервный полисахарид животных. По строению аналогичен амилопектину крахмала, но если у амилопектина точки ветвления располагаются через 20-25 остатков глюкозы, то у гликогена — через 8-10.

Клетчатка (целлюлоза) у жвачных животных расщепляется в рубце под действием ферментов микрофлоры до глюкозы и далее — ЛЖК (летучих жирных кислот). У моногастричных животных не расщепляется, но улучшает перистальтику кишечника. Состоит из остатков  $\beta$ - глюкозы.

Хитин — полисахарид, формирующий наружный скелет насекомых и панцирей ракообразных; состоит главным образом из N-ацетилглюкозамина (рис.1).

Гетерополисахариды (гетерогликаны) при гидролизе образуют смесь различных производных моносахаридов — уроновые кислоты и аminosахара). Большинство полисахаридов этой группы в различной степени эстерифицировано остатками серной кислоты, которые усиливают их кислотные свойства. Присутствуют в организме как в свободном виде, так и в составе протеогликанов и гликопротеинов. Основные представители гетерополисахаридов — гиалуроновая кислота, гепарин, хондроитинсульфаты, кератансульфаты.

Гиалуроновая кислота является высокомолекулярным веществом. Входит в состав основного вещества соединительной ткани. Обнаруживается в стекловидном теле глаза, пупочном канатике, синовиальной жидкости суставов. Гиалуроновая кислота построена из дисахаридных звеньев, состоящих из N-ацетилглюкозамина и глюкуроновой кислоты, соединенных в положении  $\beta$  (1—3) связью (рис.1). Повторяющиеся звенья связаны в положении  $\beta$  (1—4). За счет гидратации карбоксильных и спиртовых групп гиалуроновая кислота при образовании гелей связывает 10 000 кратный объём воды.

## **2. ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ ЗАНЯТИЯ**

### Работа 1. Обнаружение лактозы и мальтозы.

Лактоза и мальтоза с аммиаком в щелочной среде образуют при нагревании окрашенные соединения.

#### Реактивы:

Аммиак водный, концентрированный, 20% гидроксид калия, лактоза, мальтоза.

#### Оборудование:

Пробирки, водяная баня, пипетки.

#### Ход работы:

В 3 пробирки с 5 мл мочи, раствора лактозы и раствора мальтозы последовательно прибавляют 2,5 мл раствора аммиака, 0,2 мл КОН и нагревают на водяной бане 30 мин при 60°С. При наличии лактозы через несколько минут появляется коричневая окраска, при наличии мальтозы – красное окрашивание.

В моче здорового человека мальтоза и лактоза не обнаруживаются.

Результаты опыта оформляют в тетради.

### Работа 2. Обнаружение крахмала.

Крахмал с раствором йода образует окрашенное соединение синего цвета.

#### Реактивы:

1% раствор крахмала, йод, 1% раствор с 2% раствором иодида калия.

#### Оборудование:

Пробирки, водяная баня, пипетки.

#### Ход работы:

К 10 каплям крахмала добавляют 1-2 капли йода. Наблюдается ярко-синее окрашивание.

Реакцией пользуются для выявления активности ферментов, гидролизующих крахмал.

### Работа 3. Обнаружение лактозы в молоке.

В молоке дисахарид лактозу обнаруживают реактивом Фелинга, содержащего комплексно связанные с виннокислой кислотой ионы  $\text{Cu}^{2+}$ . В результате реакции образуется оксид меди (I), выделяющийся в виде красного осадка  $\text{Cu}_2\text{O}$ .

#### Реактивы:

молоко, йод, ТХУ, гидроксид натрия, реактив Фелинга.

#### Оборудование:

Пробирки, водяная баня, пипетки, фильтр.

#### Ход работы:

Предварительно осаждают белки молока добавлением трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и фильтруют. К 10 каплям фильтрата добавляют 10 капель дистиллированной воды 10 капель  $\text{NaOH}$  и 6 капель реактива Фелинга. Смесь нагревают. Отмечают характер появляющегося окрашивания.

### Работа 4. Обнаружение крахмала в продуктах питания.

Крахмал с раствором йода образует окрашенное соединение синего цвета.

#### Реактивы:

хлеб, раствор йода в иодистом калии, картофель, мука, яблоко, растительное масло, отварной рис, дистиллированная вода.

#### Оборудование:

Пробирки, пипетки, ступка с пестиком, стеклянные палочки.

#### Ход работы:

Исследуемые продукты (картофель, хлеб, мука, яблоко, растительное масло, отварной рис) по отдельности растирают до кашецеобразного состояния в ступе. В 6 пронумерованных пробирок помещают по 0,5-1 г продуктов. Во все пробирки добавляют по 2-3 мл дистиллированной воды, тщательно перемешивают. Добавляют в пробирки по 1-2 капли раствора йода. Отмечают пробирки, в которых наблюдается синее окрашивание.

#### Работа 5. Открытие фруктозы (реакция Селиванова)

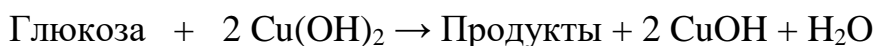
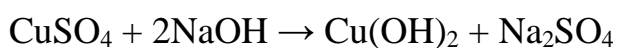
Реактивы: раствор фруктозы, раствор глюкозы, реактив Селиванова.

Оборудование: пробирки, пипетки, спиртовка.

Ход работы. В первую пробирку вносят 0,5 мл раствора фруктозы, во вторую – 0,5 мл раствора глюкозы. В обе пробирки добавляют по 0,5 мл реактива Селиванова. Пробирки осторожно нагревают на спиртовке. В пробирке с фруктозой постепенно наблюдается красное окрашивание. На первой стадии образуется оксиметилфурфурол, который во второй стадии, конденсируясь с резорцином, дает красное окрашивание.

#### Работа 6. Реакция Троммера

В основе реакции Троммера лежит окислительно-восстановительный процесс: в щелочной среде при нагревании альдегидная группа сахара окисляется, а гидрат окиси меди (осадок голубого или синего цвета) восстанавливается в гидрат закиси меди (кирпично-красный осадок). Углевод при этом дает различные продукты окисления, так как при окислении в щелочной среде моносахариды претерпевают глубокие изменения с расщеплением углеродной цепи. Среди продуктов окисления не удается выделить кислоту с тем же числом атомов углерода, как у исходного сахара (в отличие от окисления обычных альдегидов). Сахара, не имеющие свободной альдегидной группы, пробу Троммера не дают. Окислительно-восстановительную реакцию можно представить в виде следующей схемы:





Гидрат окиси окисления Гидрат закиси  
меди (голубой осадок) глюкозы меди (желтый осадок)



Гидрат окиси окисления Закись меди  
меди (голубой осадок) глюкозы (кирпично-красный осадок)

Реактивы: 0,5-процентные растворы глюкозы, фруктозы, сахарозы, мальтозы и крахмала, 2 н раствор NaOH, 0,2 н раствор CuSO<sub>4</sub>.

Оборудование: пробирки, пипетки, спиртовка.

Ход работы. В пробирку наливают раствор глюкозы и 6–8 капель 2н NaOH. Затем по каплям добавляют 0,2 н раствор CuSO<sub>4</sub> до образования нерастворимого голубого осадка. Осторожно нагревают пробирку на спиртовке. Голубой, нерастворимый в воде осадок гидрата окиси меди (II) постепенно переходит в желтый, а затем – в красный осадок закиси меди (I). Это указывает на положительную реакцию Троммера. Аналогичный опыт проводят с сахарозой, мальтозой, фруктозой и крахмалом. Делают заключение о восстанавливающих свойствах этих углеводов. Избыток медной соли маскирует реакцию, так как гидроокись меди (II)

при нагревании теряет воду и дает черный оксид меди (II).

Результаты опытов оформляют в тетради в виде таблицы:

№ пробирки	Исследуемый продукт	Наблюдаемая окраска	Содержание крахмала

***Выполнить задания в тетрадях для самостоятельной работы***

**Литература:**

1. Практика лабораторных биохимических исследований: учебное пособие. Пустовалова Л.М. – Ростов н/Д.: Феникс, 2014
2. Теория лабораторных биохимических исследований (основы биохимии): учебное пособие. Пустовалова Л.М. – Ростов н/Д.: Феникс, 2014

**Практическое занятие №6-7: Переваривание и всасывание углеводов. Промежуточный обмен углеводов, регуляция углеводного обмена. Нарушения углеводного обмена.**

*Формируемые профессиональные компетенции:* 2.1, 2.2, 2.3.

*Учебные цели* (знать, уметь, иметь практический опыт):

<b>Знать</b>	<b>Уметь</b>	<b>Владеть навыками</b>
1-8,11,13	1-14	1-9

Воспитательная цель Привитие умений и навыков учебной работы и коллективного труда. Формирование целостного миропонимания и современного научного мировоззрения, основанного на признании приоритетов общечеловеческих ценностей: гуманности, милосердия, сострадания, уважения к жизни и здоровью человека.

Развивающая цель Формирование навыков самообразования, самореализации личности и развитие речи, мышления, памяти

**Межпредметные связи** ОПД. 03 Химия, ОПД. 16 Физико-химические методы исследования и техника лабораторных работ, ОПД . 02 Анатомия.

**Вопросы для подготовки к занятию.**

1. Основные правила техники безопасности при работе в лаборатории.

2. Как происходит переваривание и всасывание углеводов ?
3. Главные пути метаболизма глюкозы.
4. В чем заключается биологическое значение цикла Кребса?
5. Что происходит в дыхательной цепи?
6. Что такое субстратное фосфорилирование?
7. Что такое окислительное фосфорилирование?
8. Клинико-диагностическое значение определения глюкозы.
9. Методы определения глюкозы.

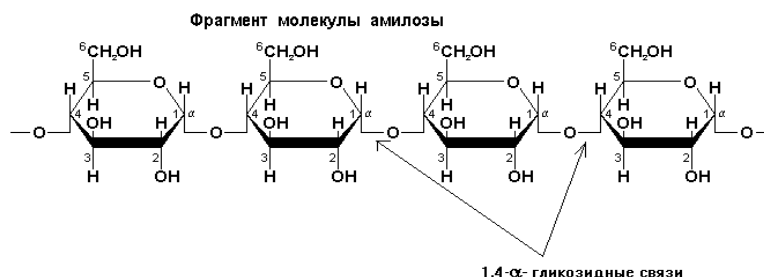
### Список понятий для усвоения темы

Гликолиз, пентозофосфатный цикл, глюконеогенез, цикл Кребса, дыхательная цепь.

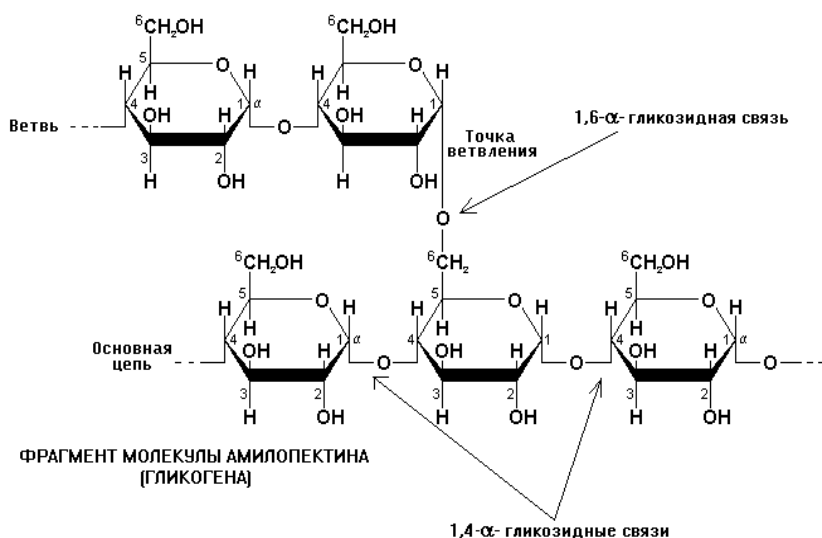
## ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ.

### Обмен углеводов. Переваривание и всасывание углеводов

В сутки взрослый человек при сбалансированном питании получает около 500 граммов углеводов в основном в виде полисахаридов, переваривание которых начинается уже в ротовой полости под действием фермента -  $\alpha$ -амилазы слюны, который расщепляет  $\alpha$ -1,4-гликозидные связи в молекулах крахмала и гликогена:



В отличие от линейной структуры одной из фракций крахмала, **амилозы**, в составе которой только  $\alpha$ -1,4-гликозидные связи, молекулы другой фракции, **амилопектина**, а также молекулы гликогена разветвлены. Связи в точках ветвления -  $\alpha$ -1,6-гликозидные.



Потенциально  $\alpha$ -амилаза слюны в ротовой полости способна расщепить пищевой крахмал или гликоген до дисахаридов мальтозы и изомальтозы. Это можно подтвердить, подержав длительное время во рту кусочек несладкого хлеба или булки. Через некоторое время можно почувствовать сладкий вкус, придаваемый образовавшейся мальтозой. Но в реальных условиях пища находится в ротовой полости не слишком длительное время и мальтоза не образуется. В этом случае  $\alpha$ -амилаза слюны успевает расщепить только некоторые 1,4- $\alpha$ -гликозидные связи, и образуются промежуточные продукты расщепления - декстрины, представляющие из себя полисахаридные фрагменты различной протяженности.

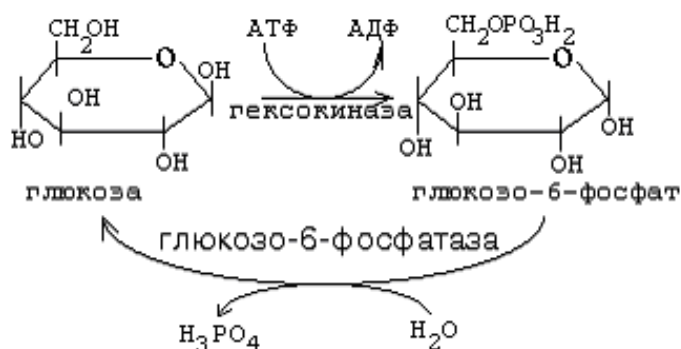
В желудке углеводы не перевариваются, т.к. в кислой среде полости желудка амилаза теряет свою активность. Переваривание углеводов возобновляется в тонком кишечнике, где имеется слабощелочная среда, оптимальная для панкреатической  $\alpha$ -амилазы (она образуется в поджелудочной железе), которая завершает расщепление полисахаридов и олигосахаридов до дисахарида мальтозы.

Дисахарид мальтоза и остальные дисахариды, поступившие с пищей, расщепляются ферментами пристеночного переваривания углеводов до моносахаридов. Эти ферменты выделяются слизистой оболочкой кишечника в составе кишечного сока.

После всасывания глюкоза по системе воротной вены поступает в печень. В печени основное количество глюкозы идет на синтез гликогена, а оставшаяся глюкоза идёт в общий кровоток для питания других клеток. Так происходит после принятия пищи, в состоянии "натошак" (вне приёма пищи) гликоген в

печени постепенно распадается до глюкозы, и глюкоза из печени уходит в общий кровоток к другим тканям. Эти механизмы поддерживают концентрацию глюкозы в крови на постоянном уровне: 3.9 - 6.1 ммоль/л.

Под действием инсулина (пептидного гормона, который образуется в поджелудочной железе) глюкоза проникает в клетки тканей, где фосфорилируется за счёт АТФ под действием фермента *гексокиназы*. Тем самым глюкоза активируется к дальнейшим превращениям, а также не выходит обратно из клетки.



После образования глюкозо-6-фосфата начинается разветвление дальнейших *путей метаболизма глюкозы*. Главные пути дальнейших превращений глюкозы таковы:

1. Синтез гликогена.
2. Дихотомический путь (непрямое окисление глюкозы).
3. Апотомический (прямое окисление глюкозы или пентозофосфатный цикл).
4. Различные виды брожения (характерно для микроорганизмов)

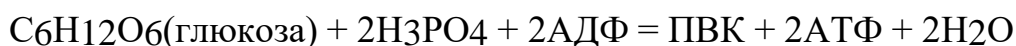
**Синтез и распад гликогена.** Синтез гликогена протекает не во всех тканях, а только в печени, мышцах и в лейкоцитах. Молекула гликогена синтезируется не с "нуля", а происходит постепенное удлинение уже имеющегося кусочка цепи: "затравки". И при распаде гликогена никогда не происходит полного разрушения его молекул.

Для включения одного остатка глюкозы в молекулу гликогена клетка расходует 2 молекулы АТФ. Гликоген, как резерв глюкозы, накапливается в клетках во время пищеварения. Расщепление гликогена в печени или его мобилизация осуществляется при участии фермента гликогенфосфорилазы часто называемой просто фосфорилазой. Заметим, что расщепление гликогена до глюкозы не нуждается в дополнительном притоке энергии.

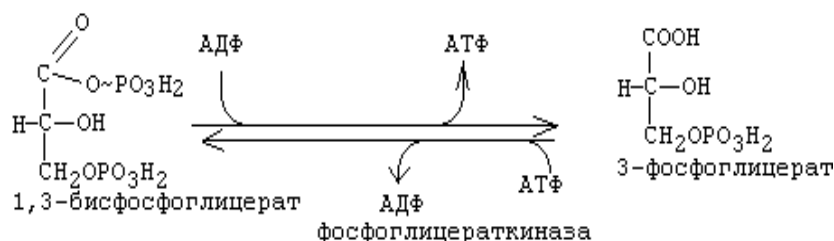
## Дихотомический путь распада глюкозы

Это главный путь распада углеводов до конечных продуктов. Так распадается 70-75% глюкозы, которая поступает в клетку. Это самый длинный путь распада углеводов, который начинается с гликолиза.

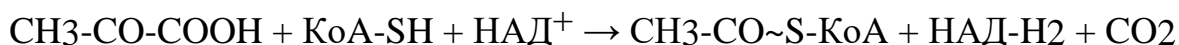
**Гликолиз** (греч. glykys сладкий + lysis расщепление)- анаэробное окисление глюкозы до молочной кислоты (неполное окисление глюкозы) - протекает в цитоплазме. Рассмотрим его основные этапы. Бескислородный гликолиз представляет собой сложный многоступенчатый процесс из десяти последовательных реакций. Каждая реакция катализируется специальным ферментом. В итоге, как правило, глюкоза окисляется не до молочной кислоты, а только до пировиноградной кислоты (ПВК):



Энергетический выход при гликолизе составляет две молекулы АТФ (четыре молекулы АТФ образуется путем **субстратного фосфорилирования**, две молекулы АТФ расходуются на активирование). Суть субстратного фосфорилирования заключается в том, что АТФ образуется путем фосфорилирования АДФ (присоединения к АДФ остатка фосфорной кислоты) за счет фосфорильной группы субстрата, содержащего макроэргическую связь, например, 1,3-дифосфоглицериновой кислоты :



Основной выход энергии и молекул АТФ происходит на, кислородном этапе гликолиза, называемом еще **аэробным дыханием**, который протекает в митохондриях. Начинается он с **окислительного декарбоксилирования пирувата** (ПВК), ускоряемого комплексом ферментов - пируватдегидрогеназным комплексом, при этом образуется ацетил-коэнзим А (АцКоА) - Ко-энзим А производное уксусной кислоты.



Ацетил-КоА вступает в **цикл Кребса** (цикл лимонной кислоты, цикл трикарбоновых кислот (ЦТК)).

## Цикл Кребса (цтк)

Исходным субстратом ЦТК служит ацетил-КоА, который в реакциях этого цикла полностью окисляется до углекислого газа и воды. Реакции ЦТК представлены на рисунке 22.

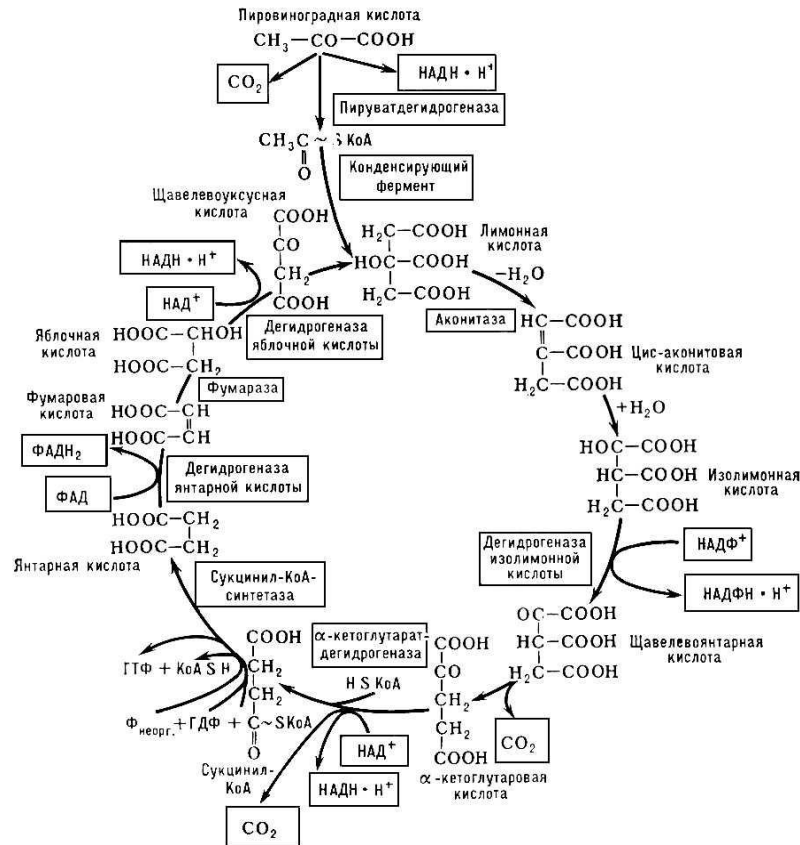


Рис. 22. Реакции цикла Кребса

Этот цикл замыкается на щавелевоуксусной кислоте (ЩУК), таким образом эта кислота выполняет функцию катализатора. В результате одного оборота цикла происходят два декарбоксилирования, четыре дегидрирования и одно фосфорилирование. Итогом 2 декарбоксилирований является выведение из цикла 2 атомов углерода (2 молекулы  $\text{CO}_2$ ), т. е. ровно столько, сколько его поступило в виде ацетильной группы. В результате реакций дегидрирования образуются восстановленные формы кофакторов - 3 молекулы  $\text{НАД-Н}_2$  и 1 молекула  $\text{ФАД-Н}_2$ , т.е. водород в цикле Кребса не выделяется в свободном состоянии, его акцептируют кофакторы дегидрогеназ, выступая в качестве промежуточных акцепторов.

Если конечным акцептором в цепи переноса водорода выступает не кислород, а другие вещества (например пировиноградная кислота в случае спиртового

брожения), то такой тип окисления называют *анаэробным окислением*. Таким образом, биологическое окисление - это дегидрирование субстрата с помощью промежуточных переносчиков водорода и его конечного акцептора.

Восстановленные формы кофакторов окисляются в дыхательной цепи, при этом, в конечном итоге, восстанавливается молекулярный кислород, который является, таким образом, конечным акцептором электронов и катионов водорода для аэробных организмов, именно в этом смысле цикл Кребса является аэробным процессом. Важно, что АцКоА, вступающий в ЦТК, образуется не только из углеводов, но и из жиров и аминокислот. Следовательно, ЦТК - это конечный "котёл" для сжигания ацетильных остатков, образующихся из углеводов, жиров и белков. ЦТК объединяет все метаболиты, образующиеся при распаде углеводов, жиров и белков, снабжает клетки рядом предшественников для биосинтетических процессов. Работа цикла Кребса сопряжена с функционированием дыхательной цепи. При этом образуется 12 АТФ в расчете на молекулу АцКоА, вступившую в цикл. Если рассчитать на 1 молекулу глюкозы, то образуется 24 АТФ.

### Дыхательная цепь (электронтранспортная цепь)

*Дыхательная цепь* - совокупность последовательных окислительно-восстановительных реакций, в ходе которых происходит многоступенчатый перенос электронов от восстановленных форм кофакторов (систем НАД, ФАД) через цепь промежуточных переносчиков в конечном итоге на молекулярный кислород (Рис.23)



Рис.23. Схема дыхательной цепи.

В клетках у эукариот дыхательная цепь расположена во внутренней мембране митохондрий, у дышащих бактерий – в цитоплазматической мембране специализированных структурах – мезосомах, или тилакоидах.

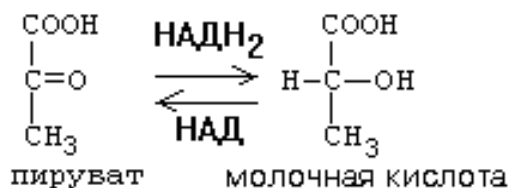
Процесс потребления клетками тканей организма кислорода, который участвует в биологическом окислении, называется тканевое дыхание, аэробное окисление. Каждый промежуточный переносчик (коэнзим Q (КоQ), цитохромы) вначале выступает в роли акцептора электронов и протонов и из



окисленного состояния переходит в восстановленную форму. Затем он передает электрон следующему переносчику и снова возвращается в окисленное состояние. На последней стадии переносчик передает электроны кислороду, который затем восстанавливается до воды.

Значение цепи биологического окисления заключается в том, что электроны, переходя от одного переносчика на другой, постепенно опускаются с более высокого на более низкий энергетический уровень, постепенно теряя при этом всю заключенную в них энергию, которая составляет в среднем 2377,2 кДж/моль (56,6 ккал/моль). Освободившаяся энергия частично рассеивается в виде тепла, а большая часть идет на образование АТФ. Если первичным акцептором водорода является НАД, то образуется три молекулы АТФ, если же ФАД,— то две молекулы АТФ. Такой путь синтеза АТФ носит название *окислительного фосфорилирования*, т. е. АТФ образуется путем присоединения к АДФ ортофосфорной кислоты с использованием энергии, освобожденной при окислении различных веществ. Из каждой молекулы глюкозы образуется 38 молекул АТФ.

При интенсивной физической работе бывают ситуации, когда в клетку не успевает поступать кислород. При этом распад углеводов временно протекает в анаэробных условиях и гликолиз идет до конца, до молочной кислоты — токсичного для нервных и мышечных клеток соединения. Последнюю реакцию гликолиза ускоряет фермент лактатдегидрогеназа, содержащий в качестве небелковой части систему НАД (См. Рис.11). Уравнение протекающей реакции:



При сохранении кровообращения этот наработанный в клетках лактат выносится кровью и основная его часть метаболизируется в печени или в сердечной мышце. В миокарде лактат окисляется до углекислого газа и воды; в печени же лишь примерно 1/5 поступающего лактата подвергается окислению до конечных продуктов, а 4/5 - ресинтезируются в глюкозу в ходе интенсивно идущего в печени процесса *глюконеогенеза*.

*глюконеогенез* представляет собой обращение процесса гликолиза, за исключением трех необратимых реакций. За сутки в организме человека за

счет глюконеогенеза может быть синтезировано до 100-120 г глюкозы, которая в условиях дефицита углеводов в пище в первую очередь идет на обеспечение энергетике клеток головного мозга. Кроме того, глюкоза служит единственным видом энергетического топлива в мышцах в условиях гипоксии, её окисление является также единственным источником энергии для эритроцитов.

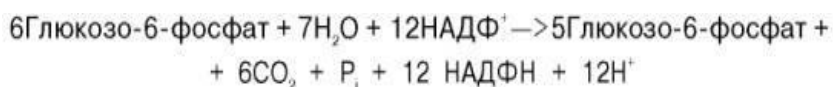
### **Прямой путь окисления глюкозы (пентозофосфатный цикл).**

Прямой путь окисления глюкозы осуществляется в цитозоле клеток животных, растений (особенно в темноте) и микроорганизмов. Пентозофосфатный цикл преобладает в клетках тех органов и тканей, где интенсивно синтезируются жиры - в эритроцитах, половых железах, коре надпочечников, печени. Особенность этого процесса - образование пентоз, накопление восстановленной формы фосфорилированной системы НАД – НАДФ·Н<sub>2</sub> - кофермента дегидрогеназ, участвующих в синтезе нуклеиновых кислот, холестерина, жирных кислот, активировании фолиевой кислоты и образовании АТФ.

Пентозофосфатный цикл включает две стадии – окислительную и неокислительную. Первая, окислительная стадия, начинается с окисления глюкозо-6-фосфата и последующего окислительного декарбоксилирования продукта (в результате от гексозофосфата отщепляется первый атом углерода).

Вторая стадия включает неокислительные превращения пентозофосфатов с образованием исходного глюкозо-6-фосфата

Валовое уравнение окислительной и неокислительной стадий пентозофосфатного цикла можно представить в следующем виде:



У молочнокислых бактерий и грибов, применяемых для приготовления кислого молока, простокваши, кефира, а также при силосовании кормов в животноводстве, две молекулы ПВК, приобретая атомы водорода, восстанавливаются в молочную кислоту С<sub>3</sub>Н<sub>6</sub>О<sub>3</sub>. Процесс превращения ПВК в клетках микроорганизмов и растений в устойчивые конечные продукты называют **брожением**. Так, дрожжевые грибки расщепляют ПВК на этиловый спирт и углекислый газ. Этот процесс, называемый **спиртовым брожением**,

используют для приготовления кваса, пива и вина. Брожение других микроорганизмов завершается образованием ацетона, уксусной кислоты и т.д.

### **Регуляция углеводного обмена.**

Регуляция углеводного обмена осуществляется на всех его этапах нервной системой и гормонами.

Постоянство уровня глюкозы в крови – важнейшее условие поддержания нормальной жизнедеятельности организма. Нормогликемия является результатом слаженной работы нервной системы, гормонов и печени.

**Печень** – единственный орган, депонирующий глюкозу (в виде гликогена) для нужд всего организма. Благодаря активной фосфатазе глюкозо-6-фосфата гепатоциты способны образовывать *свободную* глюкозу, которая, в отличие от её *фосфорилированных* форм, может проникать через мембрану клеток в общий круг кровообращения.

Из гормонов выдающуюся роль играет **инсулин**. Инсулин оказывает свое действие только на инсулинзависимые ткани, прежде всего, на мышечную и жировую. Мозг, лимфатическая ткань, эритроциты относятся к инсулиннезависимым. В отличие от других органов, действие инсулина не связано с рецепторными механизмами его влияния на метаболизм гепатоцитов. Хотя глюкоза свободно проникает в печёночные клетки, но это возможно только при условии повышенной её концентрации в крови. При гипогликемии, напротив, печень отдаёт глюкозу в кровь (даже несмотря на высокий уровень инсулина в сыворотке).

Наиболее существенным действием инсулина на организм является снижение нормального или повышенного уровня глюкозы в крови – вплоть до развития гипогликемического шока при введении высоких доз инсулина. Уровень глюкозы в крови снижается в результате: 1. *Ускорения поступления глюкозы в клетки.* 2. *Повышения использования глюкозы клетками.*

1. Инсулин ускоряет поступление моносахаридов в инсулинзависимые ткани, особенно глюкозы (а также сахаров схожей конфигурации в положении С1-С3), но не фруктозы. Связывание инсулина со своим рецептором на плазматической мембране приводит к перемещению

запасных белков-переносчиков глюкозы (*глут 4*) из внутриклеточных депо и включению их в мембрану.

2. Инсулин активирует использование клетками глюкозы путём:

- активирования и индукции синтеза ключевых ферментов гликолиза (глюкокиназы, фосфофруктокиназы, пируваткиназы).
- Увеличения включения глюкозы в пентозофосфатный путь (активирование дегидрогеназ глюкозо-6-фосфата и 6-фосфоглюконата).
- Повышения синтеза гликогена за счёт стимуляции образования глюкозо-6-фосфата и активирования гликогенсинтазы (одновременно инсулин ингибирует гликогенфосфорилазу).
- Торможения активности ключевых ферментов глюконеогенеза (пируваткарбоксилазы, фосфоенол-ПВК-карбоксикиназы, бифосфатазы, глюкозо-6-фосфатазы) и репрессии их синтеза (установлен факт репрессии гена фосфоенолПВКкарбоксикиназы).

Другие гормоны, как правило, способствуют увеличению содержания глюкозы в крови.

**Глюкагон** и **адреналин** приводят к росту гликемии путём активации гликогенолиза в печени (активирование гликогенфосфорилазы), однако в отличие от адреналина глюкагон не влияет на гликогенфосфорилазу *мышц*. Кроме того, глюкагон активирует глюконеогенез в печени, следствием чего также является увеличение концентрации глюкозы в крови.

**Глюкокортикоиды** способствуют повышению уровня глюкозы в крови за счёт стимуляции глюконеогенеза (ускоряя катаболизм белков в мышечной и лимфоидной тканях, эти гормоны увеличивают содержание в крови аминокислот, которые, поступая в печень, становятся субстратами глюконеогенеза). Кроме того, глюкокортикоиды препятствуют утилизации глюкозы клетками организма.

**Гормон роста** вызывает увеличение гликемии опосредованно: стимулируя распад липидов, он приводит к увеличению уровня жирных кислот в крови и клетках, снижая тем самым потребность последних в глюкозе (*жирные кислоты – ингибиторы использования глюкозы клетками*).

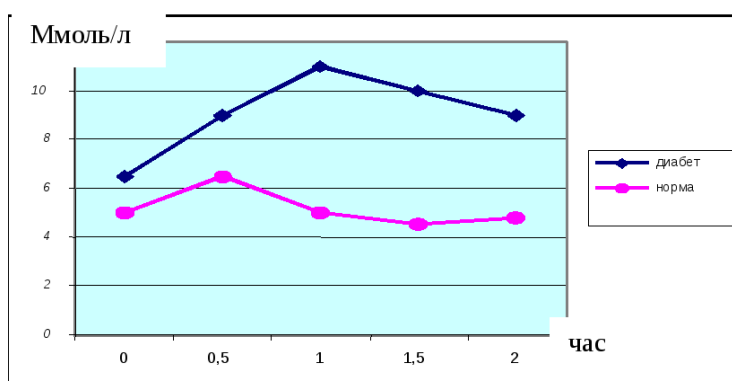
**Тироксин**, особенно вырабатываемый в избыточных количествах при гиперфункции щитовидной железы, также способствует повышению уровня глюкозы в крови (за счёт увеличения гликогенолиза).

**При нормальном уровне глюкозы** в крови почки полностью её реабсорбируют и сахар в моче не определяется. Однако если гликемия превышает 9-10 ммоль/л (**почечный порог**), то появляется **глюкозурия**. При некоторых поражениях почек глюкоза может обнаруживаться в моче и при нормогликемии.

В норме содержание глюкозы в крови натощак обычно ниже 6 ммоль/л, уровень в пределах 6-8 ммоль/л должен рассматриваться как пограничное состояние, а равный или превышающий 8 ммоль/л может служить диагнозом сахарного диабета.

Проверка способности организма регулировать содержание глюкозы в крови (**толерантность к глюкозе**) используется для диагностики сахарного диабета при постановке перорального **глюкозо-толерантного теста**:

Первая проба крови берётся натощак после ночного голодания. Затем больному в течение 5 мин. дают выпить раствор глюкозы (75г глюкозы, растворённой в 300 мл воды). После этого каждые 30 или 60 мин. на протяжении 2-х часов определяют содержание глюкозы в крови



## Сахарный диабет тип I.

По распространенности занимает 3- место среди других заболеваний, после ССЗ и рака.

В мире насчитывается 100 млн чел больных СД, и каждые 10-15 лет число больных СД удваивается. Наиболее подвержены риску к заболеванию СД малообеспеченные лица, проживающие в индустриально развитых странах.

Диабет 1 типа развивается в юношеском возрасте, иногда в детстве, и очень редко у взрослых. Протекает тяжелее, чем СД 2- типа. При отсутствии врачебного контроля- возможны острые осложнения. Встречается в 10 раз меньше, чем СД 2 типа.

Регуляция углеводного обмена осуществляется гормонами Инсулином и Глюкагоном. Эти же гормоны влияют на механизм депонирования и мобилизации гликогена, а также на метаболизм жиров.

Инсулин и Глюкагон это главные регуляторы изменений метаболизма при смене состояний пищеварения и голодания ( абсорбтивное и постабсорбтивное состояния). Пищеварение длится 10-15 час в сутки, а расход энергии все 24 час.( снижен ночью). Поэтому часть энергии депонируется, для того, чтобы использоваться в постабсорбтивный период.

### **Инсулинзависимый сахарный диабет- аутоиммунное заболевание**

При этом типе Д происходит разрушение бета- клеток в рез-те аутоиммунных реакций.

Нарушение синтеза гликогена и жиров при дефиците Инсулина.

Для всех форм СД характерна сниженная толерантность к Глюкозе, т.е. гиперглюкоземия после приема пищи или даже натощак.

Другими характерным признаком СД является повышенная концентрация в крови ЛПОНП, СЖК и главные кетоновых тел. Повышенное содержание ЖК в крови ведет к поглощению их печенью, где из них синтезируются ТГ ( в адипоцитах), который далее в составе ЛПОНП секретируются в кровь. Другая часть ЖК вступает на путь бета- окисления в митохондриях печени, образуется СН<sub>3</sub>-СО-SКоА, из которого далее синтезируются кетоновые тела.

### **Коматозные состояния ( острые осложнения ) при СД как результат нарушения обмена глюкозы и жиров**

При СД возможна **гипергликемическая кома** ( глюкоза в крови 20-30 ммоль/л, иногда и более) . При инсулинотерапии может быть **гипогликемическая кома**, связанная с передозировкой ИНС.

Ацидоз при диабетической коме- это накопление органических кислот: кетоновых тел, лактата, пирувата, конц-я кетоновых тел- 2ммоль/л, что в 200 раз превышает норму. Она повышается как следствие повышенного синтеза кетоновых.тел в печени, но и является результатом олигурии и анурии, которые часто бывают при коме. рН крови снижается до 7.0 и ниже ( при норме 7.4)

Первое проявление болезни в 15-30% случаев сопровождается кетоацидозом и комой. Смертность от диб. комы остается высокой 1-30% Основной причиной смерти больных СД в настоящее время являются поздние осложнения.

**Поздние осложнения СД** подразделяют на две группы:

- микрососудистые поражения ,приводящие к возникновению нефропатии,невропатии,ретинопатии;
- микрососудистые осложнения,связанные с развитием атеросклероза.

**Диагностика сахарного диабета.**

Концентрация Глюкозы больше 7. 2 ммоль/л указывает на СД.

И нет необходимости проводить тест толерантности к глюкозе.

Наличие гликозилированного Нв. Обычно уровень НвА1с, -5% от всего содержания Нв. При СД его концентрация увеличивается в 2-3 раза.

Инс и С-пептид секретируются бета- клетками в эквимольных количествах. В печени задерживается около 60% ИНс, поступающего с кровью воротной вены из поджелуд. железы. Поэтому отношение С-петид/ Инс в воротной вене и периф. кровообращении при н.ус. равно примерно—3/1. С-пептид удаляется обычно через почки его суточная секреция-45 мкг и пропорц. суточной секреции ИНС.

Альбуминурия.- ранний признак СД. В норме с мочой-выводится в среднем 8мг А. При выделении 30-300мг, микроальбуминурия. Причем через 10 лет после постановки диагноза увеличивается на 15-40% в год.

### **Гликогеновые болезни.**

Гликогеновые болезни относятся к наследственным нарушениям обмена. Они делятся на две основных группы: 1. *Гликогенозы* – развиваются в результате недостаточной активности или *отсутствия ферментов*, ответственных за *распад* гликогена. 2. *Агликогенозы* – результат *недостаточности ферментов синтеза* гликогена.

Характерным для всех гликогенозов является гепатомегалия, мышечная слабость, гипогликемия натощак. Введение адреналина таким больным вызывает не гипергликемию, а гиперлактатацидемию. Жизнь таких больных укорачивается.

При **агликогенозах** в результате нарушения синтеза гликогена страдают энергетические ресурсы клетки.

### **Мукополисахаридозы.**

Это врожденные заболевания человека, характеризующиеся избыточным накоплением и выделением олигосахаридных фрагментов протеогликанов, Встречается при недостатке одного или нескольких лизосомальных ферментов. Эти заболевания связаны с нарушением деградации дерматансульфата, либо гепарансульфата (или обоих), последние накапливаются внутри лизосом. Иногда фрагменты этих веществ после частичного расщепления гиалуронидазой находят в моче. Мукополисахаридозы могут быть диагностированы в период беременности при определении активности соответствующих ферментов в клетках амниотической жидкости.

## **2. ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ ЗАНЯТИЯ**

### **1. Определение глюкозы в моче индикаторными тест-полосками.**

**Полоски индикаторные предназначены для визуального качественного или полуколичественного определения глюкозы в моче человека (уровня сахара в моче).**

Они могут быть использованы для экспресс-анализа уровня глюкозурии и косвенно степени гипергликемии в медицинских учреждениях и в домашних условиях.



Полуколичественное определение глюкозы в моче дает возможность контролировать уровень глюкозурии, выбрать соответствующую диету, а также корректировать ход лечения.

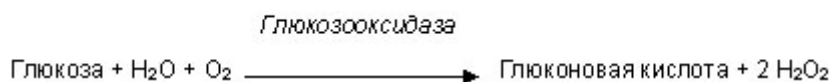
Перед проведением анализа наберите мочу в чистую емкость (не более чем за 2 часа до проведения анализа).

1. Возьмите одну тест-полоску и погрузите ее в воду на 2-3 секунды — так, чтобы индикаторный элемент оказался в моче;
2. Извлеките тест-полоску и стряхните излишек жидкости с сенсорного элемента или ребром промокните о чистую впитывающую бумагу;
3. Через 1 минуту сравните окраску индикатора с цветовыми полями шкалы на упаковке либо используя анализатор мочи.

## **2.Определение глюкозы в крови глюкозооксидазным методом.**

### **Глюкозооксидазный метод**

Сегодня наибольшее распространение получили методы, основанные на использовании фермента — глюкозооксидазы. В основе метода лежит следующая реакция:



Глюкозооксидаза катализирует перенос двух водородных атомов с первого углеродного атома глюкозы на кислород, растворенный в жидком реагенте. При этом в ходе реакции образуется в эквимольных количествах перекись водорода. Т.е. концентрация образовавшейся перекиси водорода точно равна определяемой концентрации глюкозы. Следовательно, использование глюкозооксидазной реакции, трансформировало задачу определения концентрации глюкозы в задачу определения концентрации перекиси водорода, которая, как будет показано ниже, значительно проще первой. И здесь есть несколько способов, широко используемых сегодня в лабораторной практике (см. схему).



Среди вышеперечисленных способов регистрации наибольшее распространение получил фотометрический биохимический метод, в котором молекулы перекиси водорода под действием фермента пероксидазы расщепляются с образованием активной формы кислорода – супероксид анион-радикала –  $O_2^-$ , который в свою очередь окисляет хромоген, что приводит к значительному изменению спектра поглощения хромогена.

Большая популярность данного метода определения глюкозы объясняется его высокой специфичностью и простотой выполнения. Метод можно реализовать как с применением обычного фотометра

(лучше специализированного биохимического фотометра типа Микролаб 540), так и с помощью автоматических биохимических автоанализаторов.

Глюкозооксидазный метод признан сегодня одним из самых точных количественных методов определения глюкозы. В качестве биологического материала используется как сыворотка крови, так и цельная кровь. При работе с последней следует учитывать тот факт, что при взятии капиллярной крови доля сыворотки (плазмы) зависит от величины гематокрита, что может негативно отразиться на точности результата. Поэтому при определении глюкозы вышеописанным методом предпочтительно использовать сыворотку крови пациента.

### **Определение глюкозы набором ГЛЮКОЗА АГАТ**

Набор предназначен для количественного и качественного колориметрического определения концентрации глюкозы в сыворотке и плазме крови, цельной крови и моче человека глюкозооксидазным методом в клинико-диагностических и биохимических лабораториях и в научно-

исследовательской практике. Набор рассчитан на проведение 400 определений при расходе 1,0 мл рабочего раствора на один анализ.

## **ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ**

Глюкозооксидаза окисляет D-глюкозу до глюкуроновой кислоты с образованием перекиси водорода; последняя под действием пероксидазы реагирует с 4-аминоантипирином и фенолом с образованием соединения красного цвета, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации глюкозы в анализируемом образце и измеряется фотометрически при длине волны 510 (470–540) нм.

## **СОСТАВ НАБОРА**

- 1. Концентрат буфера с фенолом** (фенол — 20,7 г/л, калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный — 137 г/л, калий фосфорнокислый однозамещенный — 55 г/л), 10 мл — 2 флакона.
- 2. Субстратно-ферментная смесь сухая** (4-аминоантипирин — 0,032 г, глюкозооксидаза — 3000 МЕ, пероксидаза — 300 МЕ) — 2 флакона.
- 3. Антикоагулянт сухой** (натрий хлористый — 4,2 г, натрий фтористый — 0,11 г, этилендиамин-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты динатриевая соль 2-водная — 0,2 г) — 1 упаковка.
- 4. Калибровочный раствор глюкозы** (глюкоза — 10 ммоль/л, бензойная кислота — 1,8 г/л), 2,0 мл — 1 флакон.

## **АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА**

**Линейная область** определения концентрации глюкозы — в диапазоне от 2 до 20 ммоль/л, отклонение от линейности — не более 5%.

**Чувствительность определения** — не более 1 ммоль/л.

**Воспроизводимость:** коэффициент вариации не более 5%.

**Нормальные величины** концентрации глюкозы составляют:

— для сыворотки крови и плазмы крови 3,9–6,1 ммоль/л;

— для цельной крови 3,3–5,5 ммоль/л;

— для мочи не более 0,5 ммоль/л.

Качество набора можно оценивать по контрольным сывороткам отечественного или зарубежного производства, аттестованными данным методом. Рекомендуется в каждой лаборатории уточнить диапазон нормальных величин у обследуемого контингента.

## **МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

При работе с набором необходимо соблюдать правила техники безопасности, рекомендуемые при работе с кровью в соответствии с «Инструкцией по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебных и профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР от 17.01.91 г. и «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (М., 1981 г.). При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять или передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

## **ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАГЕНТЫ**

- Спектрофотометр, длина волны 510 нм, или фотоэлектроколориметр, длина волны 470–540 нм (зеленый светофильтр), кювета с толщиной поглощающего свет слоя 10 или 5 мм;
- пипетки, позволяющие отбирать объем жидкости 0,01 и 1,0 мл;
- колбы мерные вместимостью 200 и 500 мл;
- пробирки центрифужные вместимостью 5–10 мл;
- термостат, обеспечивающий температуру +37° С;
- центрифуга лабораторная на 3000 об/мин;
- секундомер; — вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые.

## **АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ**

Негемолизированная сыворотка или плазма крови, цельная кровь, моча.

## **ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА**

**Рабочий раствор.** В мерной колбе вместимостью 200 мл последовательно растворить в дистиллированной воде содержимое одного флакона концентрата буфера с фенолом и одного флакона сухой субстратно-ферментной смеси, затем довести объем дистиллированной водой до метки.

Рабочий раствор можно хранить в темном месте в плотно укупоренной посуде при температуре +2–8° С не более 1 месяца.

**Антикоагуляционный раствор** (для определения глюкозы в цельной крови). Содержимое упаковки с сухим антикоагулянтом количественно перенести в мерную колбу вместимостью 500 мл, растворить в дистиллированной воде и довести объем дистиллированной водой до метки. Антикоагуляционный раствор можно хранить в плотно укупоренной посуде при температуре +2–8° С не более 3 месяцев.

**Калибровочный раствор глюкозы** готов к применению.

## ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

### 1. Определение глюкозы в сыворотке (плазме) крови и моче.

Компоненты реакционной смеси внести в пробирки в количествах, указанных в таблице 1.

Таблица 1

Отмерить, мл	Опытная проба	Калибровочная проба	Контрольная (холостая) проба
Сыворотка (плазма) крови	0,01	-	-
Калибровочный раствор глюкозы	-	0,01	-
Вода дистиллированная	-	-	0,01
Рабочий раствор	1,00	1,00	1,00

Содержимое пробирок тщательно перемешать и инкубировать в течение 15 минут при температуре +37° С или в течение 30 минут при комнатной температуре (+18–25° С). Через 5–10 минут после начала инкубации пробирки интенсивно встряхнуть. После окончания инкубации измерить величину оптической плотности калибровочной и опытных проб против контрольной (холостой) пробы при длине волны 510 (470–540) нм в кювете с толщиной поглощающего свет слоя 10 или 5 мм. Окраска устойчива в течение 1 часа после окончания инкубации.

Концентрацию глюкозы рассчитать по формуле:

$$C = \frac{E_o}{E_k} \times 10,0$$

где: С — концентрация глюкозы в опытной пробе, ммоль/л;

Е<sub>о</sub> — оптическая плотность опытной пробы, ед.опт.плотн.;

Е — оптическая плотность калибровочной пробы, ед.опт.плотн.;

10 — концентрация глюкозы в калибровочном растворе, ммоль/л.

**Примечание:** при использовании кювет другого объема расход реагентов может быть пропорционально изменен с сохранением соотношения объема анализируемого образца к объему рабочего раствора 1:100.

## 2. Определение глюкозы в цельной крови.

Компоненты реакционной смеси внести в пробирки в количествах, указанных в таблице 2.

Таблица 2

Отмерить, мл	Опытная проба	Калибровочная проба	Контрольная (холостая) проба
Цельная кровь	0,1	-	-
Калибровочный раствор глюкозы	-	0,1	-
Антикоагуляционный раствор	0,9	0,9	0,1
Центрифугировать опытные пробы в течение 10 минут при 3000 об/мин			
Надосадочная жидкость	0,1	0,1	-
Рабочий раствор	1,00	1,00	1,00

Дальше определение, измерение оптической плотности и расчеты проводить так, как это указано для сыворотки (плазмы) крови.

## 3. Качественное определение глюкозы в моче.

В центрифужной пробирке смешать 0,2 мл рабочего раствора, 0,02 мл мочи и инкубировать в течение 15–20 минут при комнатной температуре (+18–25° С). Пробы мочи, вызывающие покраснение реакционной смеси, считать положительными.

## УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Набор должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2–8° С в течение всего срока годности. Допускается хранение наборов при температуре +25° С не более 5 суток. Срок годности набора — 2 года. Рабочий раствор может храниться в темном месте в плотно закупоренной посуде при температуре +2–8° С не более 1 месяца. Антикоагуляционный раствор может храниться в плотно закупоренной посуде при температуре +2–8° С не 3 трех месяцев. Калибровочный раствор глюкозы после вскрытия флакона может храниться в закупоренном виде при температуре +2–8° С не 3 трех месяцев. При получении значений концентрации глюкозы выше 20 ммоль/л анализируемый образец необходимо развести дистиллированной водой в соотношении 1:1, повторить анализ и полученный результат умножить на 2.

#### ЛИТЕРАТУРА.

1. Практика лабораторных биохимических исследований: учебное пособие. Пустовалова Л.М. – Ростов н/Д.: Феникс, 2014
2. Теория лабораторных биохимических исследований (основы биохимии): учебное пособие. Пустовалова Л.М. – Ростов н/Д.: Феникс, 2014
3. Теория и практика лабораторных биохимических исследований учебник/Н.В.Любимова,И.В.Бабкина,Ю.С.Тимофеев-М.:ГЭОТАР-Медиа,2020.416с.:ил.

### **1.ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ПО РАЗДЕЛУ ОБМЕН УГЛЕВОДОВ**

Выберите правильный ответ

1. При гидролизе лактозы образуются:

- а) галактоза
- б) фруктоза
- в) манноза
- г) сахароза
- д) глюкоза

2. Сахароза в организме может расщепляться только в:

- а) мозге
- б) печени
- в) мышцах

- г) кишечнике
- д) селезенке

3. Наибольшее содержание гликогена в организме человека (по массе) в:

- а) печени
- б) в мышцах
- в) мозге
- г) почках
- д) жировой ткани

4. При гидролизе сахарозы образуются:

- а) галактоза
- б) манноза
- в) фруктоза
- г) глюкоза
- д) сорбоза

5. Глюкоза может образоваться в организме из:

- а) ацетил-КоА
- б) пирувата
- в) лактата
- г) глицерина
- д) лейцина

6. Дисахариды:

- а) лактоза
- б) мальтоза
- в) фруктоза
- г) крахмал
- д) сахароза

7. Глюкоза образуется при переваривании:

- А. Сахарозы
- Б. Крахмала
- В. Мальтозы
- Г. Лактозы
- Д. Изомальтозы

8. Выберите правильные ответы.

Инсулинзависимые переносчики глюкозы имеют клетки:

- А. Кишечника



- Б. Мозга
- В. Жировой ткани
- Г. Скелетных мышц
- Д. Поджелудочной железы

9. Выберите правильные ответы.

Пути использования глюкозы в клетке:

- А. Превращается в другие углеводы
- Б. Депонируется в виде гликогена
- В. Используется как основной источник энергии
- Г. Превращается в жиры при избыточном поступлении
- Д. Используется для синтеза нуклеотидов

10. Выберите правильные ответы.

Транспорт глюкозы в клетки слизистой оболочки кишечника происходит:

- А. С участием белков-переносчиков
- Б. Путем активного транспорта, когда ее концентрация в просвете кишечника меньше, чем в клетках
- В. Путем простой диффузии, если ее концентрация в клетках низкая
- Г. Независимо от инсулина

## 2. Задания и упражнения

1. Назовите классификацию углеводов.
2. Назовите примеры моно-, олиго-, полисахаридов.
3. Перечислите основных представителей гетерополисахаридов.

## 3. Продолжите фразу:

1. Переваривание углеводов начинается...
2. В кислой среде желудка амилаза...
3. В тонком кишечнике оптимальная среда для...
4. Дисахариды в тонком кишечнике расщепляются под действием...
5. Глюкоза проникает в клетки тканей под действием...
6. Основные пути превращения глюкозы это...
7. Дитохимический путь распада глюкозы (гликолиз) - это...
8. Исходным субстратом для цикла Кребса служит...
9. Окислительное фосфорилирование это такой путь образования АТФ, когда...

10. Глюконеогенез это...
11. Инсулин это единственный гормон. который...
12. Нормальный уровень глюкозы в крови...
13. Инсулинзависимый сахарный диабет это...
14. Гликогеновые болезни это...
15. Если концентрация глюкозы в крови больше 7,2 ммоль/л, можно думать что у пациента...
16. Наибольшее распространение получил... метод определения глюкозы

#### **РАЗДЕЛ 4. Исследование показателей обмена белков.**

**Практическое занятие №11-12: Общая характеристика белков, их биологическое значение, структурная организация. Аминокислоты. как структурные компоненты белков.**

Формируемые профессиональные компетенции: 2.1, 2.2, 2.3.

Учебные цели (знать, уметь, иметь практический опыт):

<b>Знать</b>	<b>Уметь</b>	<b>Владеть навыками</b>
1-8,11,13	1-13	1-9

Воспитательная цель Привитие умений и навыков учебной работы и коллективного труда. Формирование целостного миропонимания и современного научного мировоззрения, основанного на признании приоритетов общечеловеческих ценностей: гуманности, милосердия, сострадания, уважения к жизни и здоровью человека.

Развивающая цель Формирование навыков самообразования, самореализации личности и развитие речи, мышления, памяти

**Межпредметные связи** ОПД. 03 Химия, ОПД. 16 Физико-химические методы исследования и техника лабораторных работ, ОПД . 02 Анатомия.

### **Вопросы для подготовки к занятию**

1. Основные правила техники безопасности при работе в лаборатории.
2. Строение и классификация  $\alpha$ -аминокислот.
3. Кислотно-основные свойства аминокислот. Реакции на их функциональные группы.
4. Уровни структурной организации белка.
5. Основные функции белков.
6. Элементарный состав белков.
7. Понятие об изоэлектрической точке (pI).
8. Качественное обнаружение белков с помощью цветных реакций.

### **Список понятий для усвоения темы**

*Амфотерность, белки, структура белка, заменимые аминокислоты, изоэлектрическая точка аминокислоты (белка), нативный белок, незаменимые аминокислоты, изоэлектрическая точка белка, гидролиз.*

## 1.ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Аминокислоты – это органические карбоновые кислоты, у которых один атом водорода углеводородной цепи замещен на аминогруппу.

Аминокислоты входят в состав белков и пептидов организма человека. Они образуют в организме многие низкомолекулярные биологически активные вещества: ГАМК ( $\gamma$  – аминomásляная кислота), биогенные амины и др. Гормоны щитовидной железы и адреналин – производные аминокислот. Аминокислоты – предшественники азотистых оснований (входящих в состав нуклеиновых кислот), порфиринов (идущих на биосинтез гемма – для гемоглобина и миоглобина), азотистых оснований (входящих в состав сложных липидов – холина, этаноламина). Участвуют в биосинтезе медиаторов в нервной системе (ацетилхолин, дофамин, серотонин, норадреналин и др.).

### Структура аминокислот

Все аминокислоты, входящие в состав белков, имеют NH (амино) – группу в  $\alpha$  – положении и относятся к  $\alpha$  – аминокислотам.

Все аминокислоты – левовращающиеся и отличаются друг от друга строением бокового радикала, т.е. физико – химическими свойствами, присущими этим радикалам. Всего известно 23 аминокислоты.

Структура аминокислот может быть выражена общей формулой:



$\text{H}_2\text{N}$  – аминогруппа,

$\text{COOH}$  – карбоксильная группа,

$\text{R}$  – радикал.

Пептиды – это органические молекулы, в состав которых входит несколько остатков аминокислот, связанных пептидной связью.

Пептиды обладают значительной биологической активностью, являясь регуляторами ряда процессов жизнедеятельности.

Белки – это органические соединения, представляющие собой полимеры природных аминокислот со специфическими структурами.

Белки являются важнейшей составной частью клеток живого организма. Они не встречаются в неживой природе. Играют первостепенную роль в функционировании живой материи. Все биологические процессы связаны при участии белков. Они – регуляторы численности нуклеиновых кислот. В качестве ферментов участвуют во всех стадиях биосинтеза полипептидов, нуклеотидов и др. соединений. Катализируют все метаболические процессы. Сократительные белки ответственны за клеточные и внутриклеточные движения. Белки и фосфолипиды образуют бислой мембраны всех клеток и субклеточных единиц. Белки обеспечивают активный транспорт веществ в клетку и из нее, транспорт кислорода к тканям и углекислого газа из тканей, перенос жирных кислот, липидов стероидов, витаминов, лекарственных веществ, неорганических ионов. Низкомолекулярные пептиды и гормоны стимулируют функциональную активность других тканей и органов. Белки защищают от проникновения в организм чужеродных агентов (за счет наличия  $\gamma$  – глобулинов). Входя в состав кожи, соединительных тканей, костей и др. выполняют опорную динамическую функцию (за счет наличия коллагена, эластина, фибронектина). Являются противоядием при отравлении солями тяжелых металлов и алкалоидами. При расщеплении 1г белка выделяется 4,1Ккал энергии. Белок расщепляется на мочевины, углекислый газ, воду.

Таким образом, белки выполняют следующие функции: ферментативную, гормональную, рецепторную, структурную (пластическую), иммунологическую, гемостатическую, противосвертывающую, геннорегуляторную (белки – гистоны, кислые белки играют роль в регуляции процесса трансляции), транспортную, сократительную, обезвреживающую, опорную (механическую), энергетическую.

#### Структура белков.

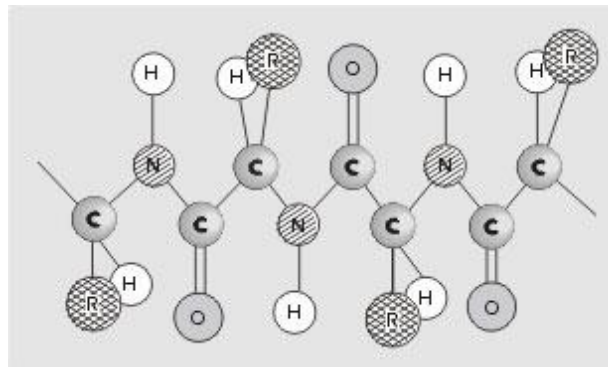
*Первичная структура* – последовательность аминокислотных остатков в олипептидной цепи. Образуется за счет пептидных связей  $\alpha$  –

карбоксильной группы одной аминокислоты и L – аминогруппы последующей аминокислоты.

(NH – CO) – пептидная связь

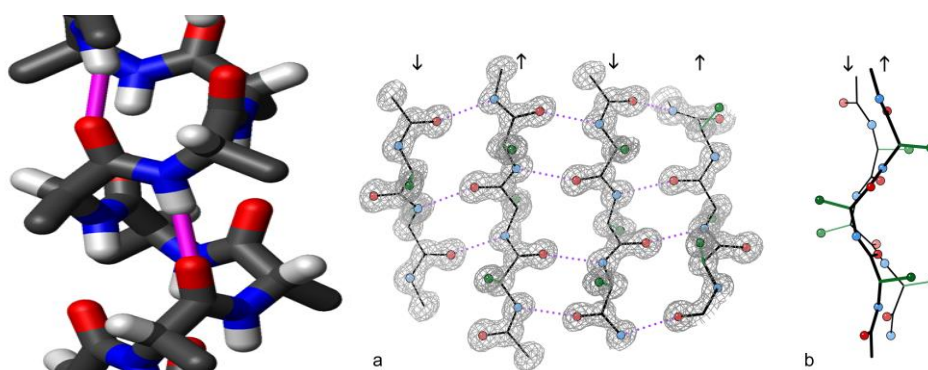


Например:



*Вторичная структура* – способ укладки полипептидной цепи в упорядоченную структуру, которая стабильна за счет водородных связей.

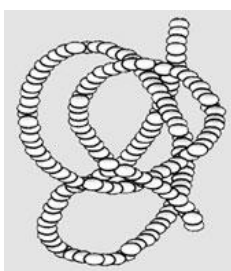
Различают:  $\alpha$  – спираль Полинга и  $\beta$  – складчатые или слоистоскладчатые структуры ( $\beta$  – структура и кросс –  $\beta$  – форма).



$\alpha$  – спираль Полинга

Степень спирализации может быть различной и говорит о наличии условий, при которых происходит нарушение спирализации, и образуются более компактные белки – формируется третичная структура белка.

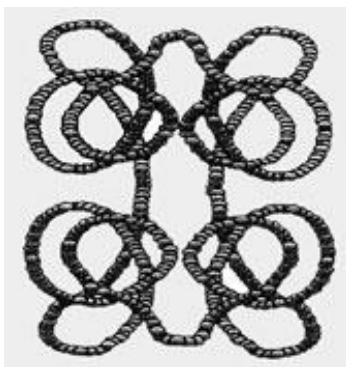
*Тетичная структура белка* – укладка полипептидной цепи в пространстве. По способу укладки различают: глобулярные и фибриллярные. Уровнем третичной организации являются домены. *Домены* – это структурно обособленные области белковой молекулы, соединенные короткими аморфными участками полипептидных цепей. Третичная структура удерживается за счет водородных ( $\text{H}^{\delta+} \dots \text{O}^{\delta-}$ ), ионных (солеобразующих) ( $-\text{NH}^{3+} \dots \text{COO}^-$ ), дисульфидных ( $-\text{S}-\text{S}$ ), гидрофобных (сил Ван – дер – Вальса) связей.



Белки, состоящие из одной полипептидной цепи, характеризуются наличием только третичной организации. Третичная структура – субъединица.

*Четвертичная структура.* Состоит из нескольких полипептидных цепей, из которых каждая цепь – это субъединица, характеризующаяся своей вторичной и третичной пространственной структурой (олигомеры) – гемоглобин, лактатдегидрогеназа, глутаминсинтетаза, гексокиназа и др.

Связь между протомерами – нековалентная. Число протомеров может быть от 2 до нескольких тысяч.



#### Физико – химические свойства белков.

Большинство белков хорошо растворимы в воде и растворах (лучше в солевых – физиологический, сульфат аммония и др., слабые кислоты). Есть белки практически не растворимые – белки опорных тканей (кератин, фиброин, коллаген). Белки обладают большой гидрофильностью, чем обусловлено высокое онкотическое давление белков. Белки в воде образуют растворы, близкие по свойствам к коллоидным растворам. Сходство определяется размером частиц. Различие – растворы белков гидрофильны по сравнению с коллоидным раствором. С коллоидным состоянием белков связан ряд характерных свойств, в частности явление светорассеивания, лежащее в основе количественного определения белков методом нефелометрии. Коллоидные частицы не проходят через полупроницаемые мембраны (целлофан, коллоидную пленку, стенку мочевого пузыря быка и т.д.), т.к. их поры меньше коллоидных частиц. Непроницаемыми для белка являются все биологические мембраны. Это свойство белковых растворов широко используется в медицине и химии для очистки белковых препаратов от посторонних примесей. Такой процесс разделения называется *диализом*. Явление диализа лежит в основе действия аппарата «искусственная почка», который широко используется для лечения почечной недостаточности. При поражении почек, капсула почечного клубочка (капсула Шумлянского – Боумана) становится непроницаемой для альбуминов сыворотки крови, и они появляются в моче.



Каждая белковая молекула окружена достаточно плотной собственной водной оболочкой, прочно фиксированной на ее поверхности. Сила, с которой белки плазмы притягивают к себе воду, называется *коллоидно – осмотическим или онкотическим давлением*. Оно равно 23 – 28 мм.рт.ст. При уменьшении количества белков или снижении их гидрофильности в плазме образуется избыток «свободной» воды, повышается гидростатическое давление в мельчайших сосудах (капиллярах) и вода начинает просачиваться сквозь стенки капилляров в ткани. Образуются онкотические (зависящие от количества и свойств белков) отеки. Онкотическое давление является частью осмотического и имеет большое значение для удержания жидкости в сосудистом русле. Входя в состав буферных систем, белки влияют на кислотно-основное равновесие крови.

*Свойства растворов белков:* способность к диффузии ограничена; осмотическое давление низкое, а онкотическое – высокое; некоторые растворы белков имеют высокую вязкость; способны к желатинированию (образованию гелей), белки способны к осаждению из раствора.

Растворы белков относительно стабильны в виду гидрофильности белков. Молекулы белка в растворе имеют 2 фактора устойчивости: гидратная оболочка и электрический заряд как результат ионизации функциональных групп аминокислот. Осаждаться могут только агрегаты белка, а затем идет седиментация (выпадение в осадок). Осаждение белков можно вызвать уменьшением влияния факторов устойчивости. Гидратную оболочку можно удалить действием солей сульфата аммония или спирта. Заряд можно уменьшить (удалить) изменяя рН среды, т.е. влияя на диссоциацию карбоксильной и аминогрупп. Различают обратимое и необратимое осаждение белков. При обратимом – структура белка не нарушается (высаливание сульфатом аммония), т.к. эти ионы оттягивают воду от белка. Необратимое – является результатом денатурации белка.

*Денатурация белка* – это негидролитическое нарушение нативной структуры белка, которая сопровождается изменением физико – химических и биологических свойств белка.

Первичная структура белка при денатурации сохраняется, а нарушается только при гидролизе. Другие уровни организации белковых молекул нарушаются. При этом разрываются нековалентные связи (водородные, ионные, гидрофобные), иногда разрываются дисульфидные

связи. Молекула белка при денатурации «развертывается» («выворачивается наизнанку»). На поверхность молекулы выходят гидрофобные аминокислоты. За их счет происходит агрегация и осаждение белков. Поэтому первый признак денатурации – осаждение белков из раствора. При этом изменяется оптическое свойство раствора белков и биологическая активность (снижается или полностью исчезает). Денатурированные белки осаждаются не всегда: в сильно кислой и сильно щелочной средах белок не выпадает в осадок. Осаждению белка препятствует большой заряд на поверхности молекулы.

*Оптические свойства раствора белка.* За счет большого размера молекулы белка способны к светорассеиванию. Наблюдается явление опалесценции – легкая мутность раствора (часть света огибает молекулу белка, а часть рассеивается, поэтому возникает эффект мутности). Эффект Фарадея – Тиндаля – появление светящегося конуса при прохождении света через раствор.

Белки способны вращать плоскость поляризованного света, т.к. белки – оптически активные вещества и состоят только из  $\alpha$  – аминокислот.

Белки способны к поглощению света. Если через раствор белка пропускать свет, то часть этого света будет поглощаться молекулами вещества только в ультрафиолетовой части спектра (до 360нм).

Белки способны к флуоресценции за счет наличия триптофана. Флуоресценция – очень чувствительный метод, зависящий от формы молекулы.

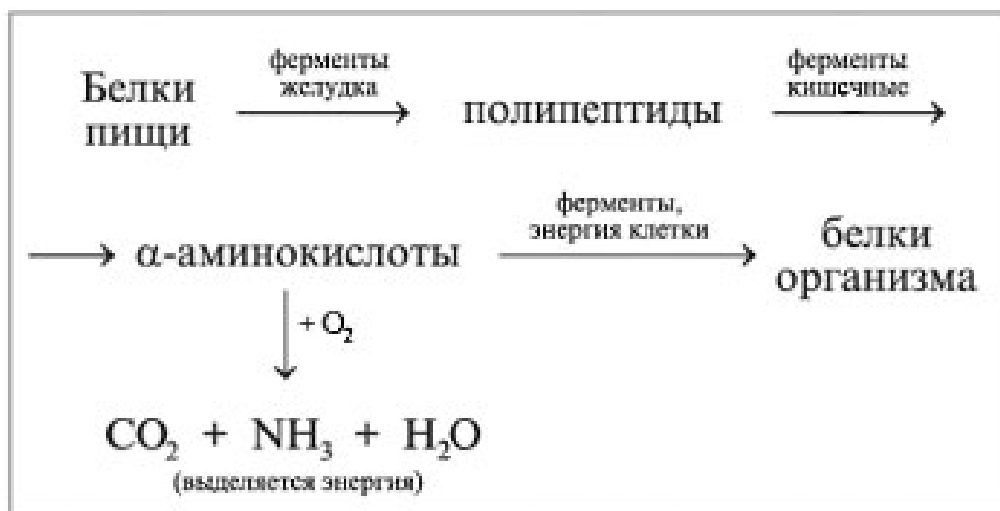
*Электрические свойства растворов белков.* Белки – полиэлектролиты, т.к. содержат в своем составе большое количество ионногенных групп, способных заряжаться (карбоксильная и аминогруппы).

*Изоэлектрическая точка белка* – это значение рН, при котором суммарный заряд белка равен нулю. Для большинства белков и.э.т. находится в слабокислой среде. И.э.т. основных белков находится в слабощелочной среде. В сильнокислой среде молекула белка имеет «+» заряд. При подкислении раствора «+» заряд увеличивается. Подщелачивание среды ведет к увеличению «-» заряда.

Если рН ниже и.э.т., то молекула белка всегда заряжена «+» и, наоборот. Заряд белка зависит от аминокислотного состава белка и рН среды. И.э.т. зависит только от аминокислотного состава. Например: альбумин – и.э.т. = 4,7, при рН = 4,7, заряд белка равен нулю; гистон – и.э.т. = 9 – 10, при рН = 4,7. И.э.т. белка определяется путем электрофореза или методом осаждения. В и.э.т. белок наименее устойчив к осаждению, т.е. осаждается очень легко.

*Молекулярная масса.* Молекулярная масса белков выражается в Дальтонах и равняется 1\12 массы углерода <sup>12</sup>С. Молекулярная масса белков очень большая. Существуют межвидовые различия молекулярной массы гомологичных белков. Например, Нв человека = 64,5кДа, Нв быка = 62кДа, инсулин человека = 5734Да, инсулин свиньи = 5704Да, инсулин быка = 5660Да.

### Схема превращения белка в организме



## 2. ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ ЗАНЯТИЯ

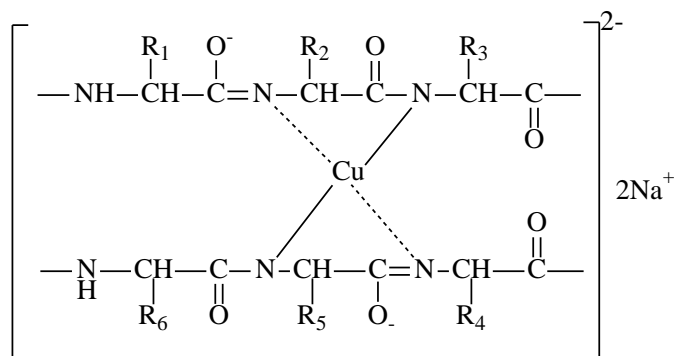
### Работа 1. Цветные реакции на белки

*Реактивы:* водный раствор яичного белка (белок одного куриного яйца отделяют от желтка, растворяют в 15-20-кратном объеме дистиллированной воды, затем раствор фильтруют через марлю, сложенную в 3-4 слоя, и хранят в холодильнике.); 10 %-ный раствор гидроксида натрия; 30 %-ный раствор гидроксида натрия; 1 %-ный раствор сульфата меди; 1 %-ный раствор ацетата свинца; концентрированная азотная кислота, 2 %-ый раствор гипобромита натрия, раствора тирозина, раствора желатина, альбумина, раствора казеина 0,1%-ного раствора фенола, реактив Миллона (раствор ртути в азотной кислоте).

*Оборудование:* пробирки; водяная баня или спиртовка, пробиркодержатель.

### Задание 1. Биуретовая реакция.

В щелочной среде белки, а также продукты их гидролиза – пептиды дают фиолетовое или красно-фиолетовое окрашивание с солями меди. Реакция обязана наличию пептидных связей в белках:



Интенсивность окраски зависит от длины полипептида.

### *Ход работы:*

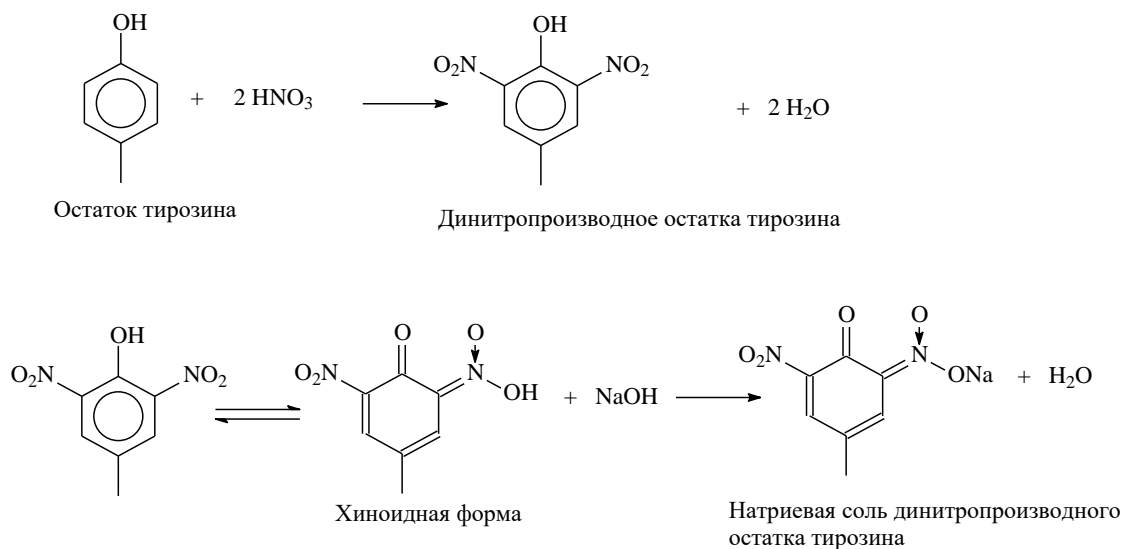
В пробирку налейте 5 капель раствора яичного белка, затем 10 капель 10 %-го раствора щелочи.

Добавьте 1-2 капли раствора сульфата меди, смесь перемешайте. Появляется красно-фиолетовое окрашивание.

*Внимание!* В пробирку нельзя добавлять избыток сульфата меди, так как синий осадок гидрата окиси меди маскирует характерное фиолетовое окрашивание биуретового комплекса белка.

## Задание 2. Ксантопротеиновая реакция.

Реакция характерна для некоторых ароматических аминокислот (фенилаланина, тирозина, триптофана), а также для пептидов, их содержащих. При действии азотной кислоты образуется нитросоединение желтого цвета. Далее нитропроизводные могут реагировать со щелочью с образованием натриевой соли, имеющей желто-оранжевое окрашивание:



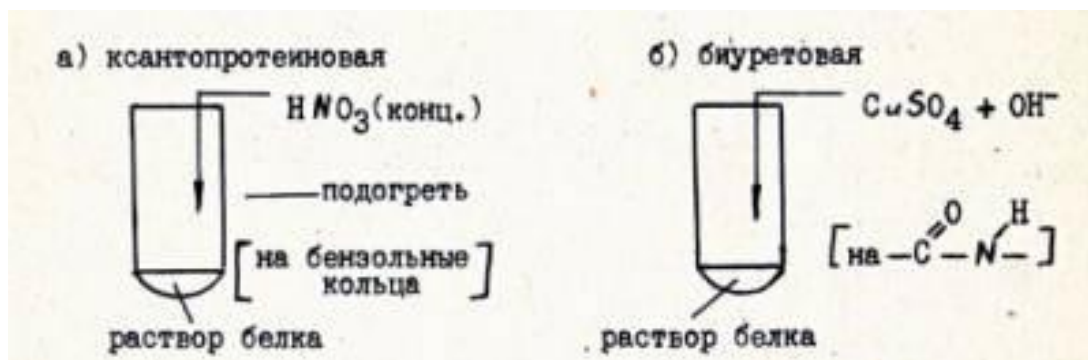
*Ход работы:*

Данную работу необходимо выполнять соблюдая особую **ОСТОРОЖНОСТЬ!**

В пробирку налейте 5 капель раствора яичного белка и **ОСТОРОЖНО** по стенке прибавьте 3-4 капли концентрированной азотной кислоты.

Смесь осторожно нагрейте. Выпадает осадок, который окрашивается в желтый цвет.

После охлаждения в пробирку **ОСТОРОЖНО** по стенке прилейте 10 капель 30 %-ого раствора  $\text{NaOH}$ , желтая окраска переходит в оранжевую.



### Задание 3. Реакция Фоля

В остатках серусодержащих аминокислот сера при щелочном гидролизе отщепляется, образуя сульфиды. Сульфиды, взаимодействуя с ацетатом свинца, дают осадок сульфида свинца черного или буро-черного цвета.

*Ход работы.*

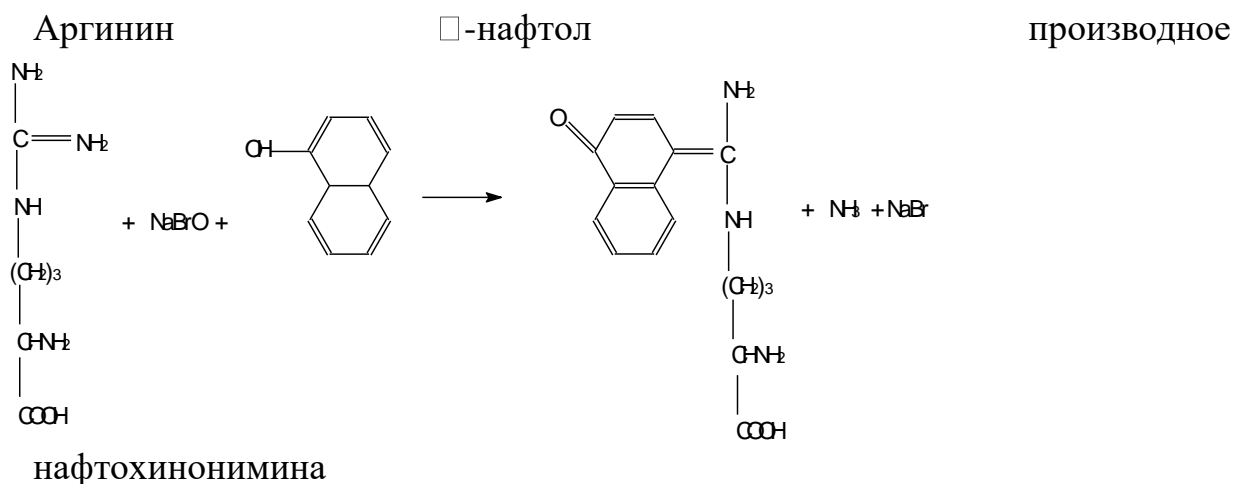
В пробирку налейте 5 капель реактива Фоля, добавьте 5 капель раствора белка.

Доведите до кипения над пламенем спиртовки, отметьте изменение окраски раствора.

### Задание 4. Реакция на аргинин (реакция Сакагучи)

Реакция обусловлена присутствием в белке аминокислоты аргинина, имеющей гуанидиновую группировку  $NH_2-C-NH-NH$

В щелочном растворе в присутствии гипохлорита натрия гуанидиновая группа аргинина окисляется. Окисленный продукт, соединяясь с нафтолом, образует продукт конденсации розово-красного цвета:



*Ход работы:*

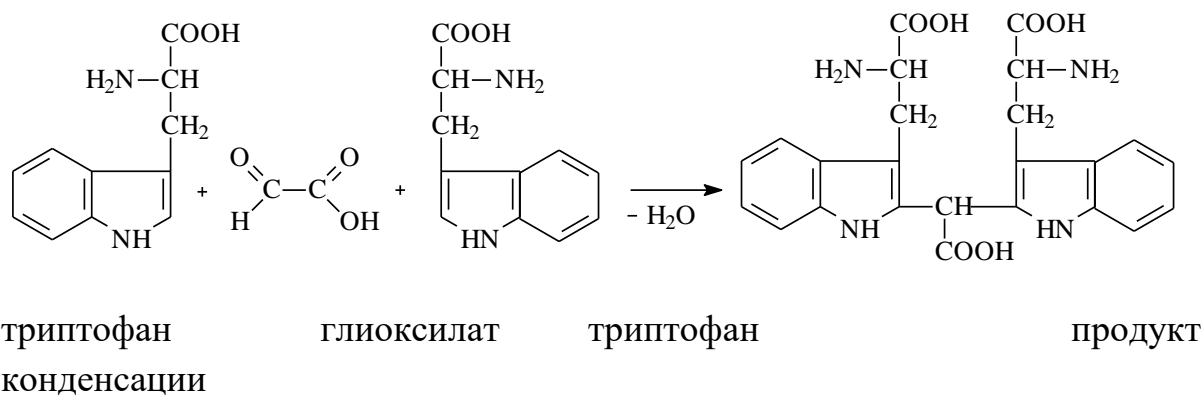
В одну пробирку налейте 1 мл 1%-ного раствора аргинина, в остальные три пробирки по 1 мл 1%-ных растворов овальбумина, казеина и желатина

Добавьте по 1-2 капли 10 % раствора NaOH и затем по 1-2 капли спиртового раствора  $\square$ -нафтола.

Перемешайте, прилейте по 1-2 капли гипохлорита натрия и вновь перемешайте. Развивается розово-красное окрашивание.

### Задание 5. Реакция Адамкевича (реакция на триптофан)

Триптофан в кислой среде реагирует со многими альдегидами, вследствие чего образуются цветные продукты конденсации с общей структурой:



*Ход работы:*

В одну пробирку налейте 1 каплю неразбавленного белка добавьте 10 капель ледяной  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , нагрейте до растворения белка.

Содержимое пробирки охладите и, сильно наклонив пробирку, очень осторожно, по стенке наслоите 1 мл концентрированной серной кислоты (жидкости не должны смешаться). При стоянии на границе двух жидкостей образуется красно-фиолетовое кольцо. При нагревании окрашивание развивается быстрее.

### Задание 6. Контрольное определение

С контрольным раствором последовательно проведите все изученные реакции на белки и аминокислоты. На основании полученных результатов сделайте вывод о присутствии в растворе того или иного белка или аминокислоты. Результаты контрольного определения оформите в виде таблицы.

п/п	Название реакции	Используемые реактивы и условия	Окраска продукта	Чем обусловлена реакция (определяемые аминокислоты)

## **Работа 2. Реакции осаждения белка**

### **Реакции обратимого осаждения белков**

Реакции осаждения белков бывают обратимыми и необратимыми.

При обратимом осаждении макромолекулы белка в основном не подвергаются глубокой денатурации, а осадки могут быть снова растворены в первоначальном растворителе. Обратимое осаждение вызывается действием нейтральных солей аммония, щелочных и щелочно-земельных металлов (высаливание), спирта, ацетона, эфира и некоторых других органических растворителей.



## Реакции необратимого осаждения белков

При необратимом осаждении происходит глубокая денатурация белка. Денатурированный белок не способен к восстановлению своих первоначальных физико-химических и биологических свойств. Необратимое осаждение вызывается высокой температурой, действием концентрированных минеральных и некоторых органических кислот, ионов тяжелых металлов, алкалоидных реагентов, детергентов, красителей.

*Реактивы:* раствор яичного белка с добавлением хлорида натрия (белок одного куриного яйца отделяют от желтка и растворяют в 230 мл дистиллированной воды, к которой прибавляют 100 мл насыщенного раствора хлорида натрия, раствор фильтруют через марлю, сложенную в 3-4 слоя, и хранят в холодильнике); насыщенный раствор сульфата аммония; сульфат аммония, растертый в порошок; 10 %-ый раствор гидроксида натрия; 1 %-ый раствор сульфата меди, концентрированные серная, соляная и азотная кислоты; 5 %-ый раствор ацетата свинца; 2,5 %-ый раствор нитрата серебра; 5 %-ый раствор сульфата меди.

*Оборудование:* пробирки; воронка для фильтрования; бумажные фильтры.

*Ход работы:*

Задание 1. Осаждение белков сульфатом аммония.

В пробирку отмерьте 2-3 мл раствора яичного белка, добавьте равный объем насыщенного раствора сульфата аммония и смесь перемешайте.

Выпадает осадок глобулинов, альбумины остаются в растворе. Осадок отфильтруйте на бумажном фильтре.

К фильтрату добавьте порошок сульфата аммония до получения насыщенного раствора (последняя порция не растворяется).

Выпадает осадок альбуминов, который также отфильтруйте.

Фильтр с осадком альбуминов промойте 5 мл воды, собирая фильтрат в чистую пробирку.

Проделайте с фильтратом биуретовую реакцию. Произошло ли растворение альбуминов?

### Задание 2. Осаждение белков спиртом.

Органические растворители вызывают осаждение белков вследствие разрушения гидратной оболочки макромолекул.

В пробирку налейте 1 мл раствора яичного белка с добавлением хлорида натрия.

По каплям прилейте 4-6 мл спирта и сильно взболтайте. Через 5-8 мин. выпадает осадок белков.

### Задание 3. Осаждение белков минеральными кислотами.

Реакция находит применение для быстрого определения белка в биологических жидкостях, например, моче.

*Ход работы:*

Данную работу необходимо выполнять соблюдая особую ОСТОРОЖНОСТЬ!

В три пробирки налейте по 15-20 капель концентрированных кислот: в первую – серной; во вторую – азотной и в третью - соляной.

Пробирки наклоните под углом 45° и ОСТОРОЖНО (из пипетки) наложите по стенке раствор белка. Пробирку держите отверстием от себя. На границе белка и кислоты появляется белое кольцо.

Пробирки осторожно встряхните. Осадки растворяются в серной и соляной кислотах, но не растворяются в азотной кислоте.



#### Задание 4. Осаждение белков солями тяжелых металлов.

Белки осаждаются солями меди, свинца, ртути, цинка, серебра и других тяжелых металлов. Свойство белков связывать ионы тяжелых металлов используется в медицине при оказании первой помощи пострадавшим от отравления солями меди, свинца, ртути.

*Ход работы:*

В три пронумерованные пробирки налейте по 5-10 капель раствора белка.

В первую пробирку по каплям прибавьте раствор ацетата свинца. Образуется осадок. Добавьте еще несколько капель, осадок должен раствориться в избытке раствора соли.

Во вторую пробирку по каплям прилейте раствор нитрата серебра. Образовавшийся осадок в избытке соли не растворяется.

В третью пробирку прибавьте 5% раствор сульфата меди до появления осадка. Убедитесь, что осадок растворяется в избытке соли.

#### Задание 5. Осаждение белков при нагревании

*Ход работы:*

В 5 пробирок налейте по 10 капель раствора белка

В первой пробирке нейтральный раствор белка нагрейте. Усиливается опалесценция, может выпасть осадок. Нагревание проводить осторожно, все время встряхивая пробирку.

К нейтральному раствору белка во второй пробирке прибавьте 1-2 капли 1% раствора уксусной кислоты, осадка при этом не образуется. При нагревании вначале появляется опалесценция, а затем при дальнейшем кипячении выпадает белый хлопьевидный осадок. Осадок появляется вследствие того, что в слабокислой среде белок находится в изоэлектрическом состоянии, денатурируясь при нагревании, легко теряет свою растворимость в результате агрегации.

В третью пробирку добавьте 1-3 капли 10% раствора уксусной кислоты и нагрейте до кипения. Осадок не выпадет, т.к. при избытке водородных ионов белки, имевшие в исходном растворе отрицательный заряд, перезаряжаются и приобретают положительный заряд, что придает им устойчивость.

В четвертую пробирку добавьте 1-3 капли 10% раствора уксусной кислоты и 2-3 капли насыщенного раствора хлорида натрия, доведите до кипения. Появляется белый хлопьевидный осадок белка, вследствие экранирования положительного заряда перезаряженных частиц белка противоположно заряженными ионами хлористого натрия путем адсорбции их.

В пятой пробирке к раствору белка добавьте 2-4 капли 10% раствора едкого натра и доведите до кипения. Осадка не образуется, так как в щелочной среде подавляется основная диссоциация белка, усиливается кислотная и отрицательный заряд на коллоидных частицах белка возрастает еще больше.

Оформление результатов:

Оформите результаты проведенных исследований в виде таблицы.

Реакция среды	Описание осадка (цвет и характер осадка)
нейтральная	

слабокислая	
Сильнокислая (10%CH <sub>3</sub> COOH)	
Сильнокислая (10%CH <sub>3</sub> COOH + NaCl)	
Щелочная (10%NaOH)	

***Выполнить задания в тетрадях для самостоятельной работы***

**Литература:**

1. Практика лабораторных биохимических исследований: учебное пособие. Пустовалова Л.М. – Ростов н/Д.: Феникс, 2014
2. Теория лабораторных биохимических исследований (основы биохимии): учебное пособие. Пустовалова Л.М. – Ростов н/Д.: Феникс, 2014

**Практическое занятие №13-14: Переваривание белков. Общие пути превращения аминокислот. Определение общего белка, альбумина. Клинико-диагностическое значение.**

Формируемые профессиональные компетенции: 2.1, 2.2, 2.3.

Учебные цели (знать, уметь, иметь практический опыт):

<b>Знать</b>	<b>Уметь</b>	<b>Владеть навыками</b>
1-8,11,13	1-14	1-9

Воспитательная цель Привитие умений и навыков учебной работы и коллективного труда. Формирование целостного миропонимания и современного научного мировоззрения, основанного на признании

приоритетов общечеловеческих ценностей: гуманности, милосердия, сострадания, уважения к жизни и здоровью человека.

Развивающая цель Формирование навыков самообразования, самореализации личности и развитие речи, мышления, памяти .

Межпредметные связи ОПД. 03 Химия, ОПД. 16 Физико-химические методы исследования и техника лабораторных работ, ОПД . 02 Анатомия.

### **Вопросы для подготовки к занятию**

1. Основные правила техники безопасности при работе в лаборатории.
2. Этапы переваривания белков в ЖКТ.
3. Какие ферменты принимают участие в переваривании белков в ЖКТ.
4. Промежуточный обмен аминокислот.
5. Фракции белков сыворотки крови человека, их функции.
6. Унифицированные методы определения общего белка и альбумина.

## **ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ.**

### **Переваривание белков**

Переваривание белков происходит в желудке и в тонком кишечнике. Оно сводится к ферментативному гидролитическому расщеплению белков пищи до аминокислот. Переваривание белков в желудочно-кишечном тракте имеет ряд особенностей:

- протеолитические ферменты выделяются в неактивном состоянии (защитный механизм от переваривания тканевых белков);
- их активирование происходит в просвете желудочно-кишечного тракта путём частичного протеолиза;
- протеазы желудочно-кишечного тракта отличаются субстратной специфичностью, могут относиться или к эндопептидам, или экзопептидазам.

**В желудке** основным ферментом, расщепляющим белки, является **пепсин**. Он выделяется в неактивном состоянии в виде профермента пепсиногена. При участии HCl происходит частичный протеолиз пепсиногена и превращение его в активную форму пепсин.

Пепсин относится к эндопептидазам, разрывает в белках внутренние пептидные связи, образованные с участием остатков тирозина и фенилаланина..

Роль HCl в переваривании белков:

- участвует в активации пепсиногена;
- обеспечивает оптимум pH для пепсина (pH = 1-2);
- вызывает частичную денатурацию белка, способствует их набуханию;
- является бактерицидным барьером.

Слизистая желудка имеет целый ряд защитных механизмов от агрессивного действия пепсина и соляной кислоты. К ним относятся:

а) выработка слизи (основной её компонент протеогликаны);

б) выделение пепсина в неактивном состоянии;

Дальнейшее переваривание белков осуществляется в тонком кишечнике под действием ферментов поджелудочной железы и собственных ферментов слизистой оболочки кишечника. К ферментам **поджелудочной железы** относятся трипсин, химотрипсин, эластаза, карбоксипептидазы. **Трипсин** выделяется поджелудочной железой в неактивном состоянии в виде трипсиногена, который активируется ферментом энтеропептидазой (энтерокиназой), вырабатываемой слизистой кишечника. Трипсин, в свою очередь, активирует в кишечнике другие протеолитические ферменты. **Химотрипсин** вырабатывается в неактивном состоянии в виде химотрипсиногена, активируется частичным протеолизом трипсином. Химотрипсин относится к эндопептидазам, содержит в активном центре гидрофобные аминокислоты, расщепляет в белках связи, образованные COOH – группами ароматических аминокислот (фенилаланин, тирозин). **Эластаза** образуется из проэластазы под действием трипсина путём частичного протеолиза. **Карбоксипептидазы** относятся к экзопептидазам, отщепляют от белков концевые аминокислоты.

В тонком кишечнике происходит полное гидролитическое расщепление пищевых белков до аминокислот, которые не обладают видовой специфичностью. Образовавшиеся аминокислоты подвергаются всасыванию.

## **Всасывание аминокислот**

Всасывание аминокислот представляет собой активный Na-зависимый процесс, требующий затрат энергии АТФ. Перенос отдельных аминокислот осуществляется специальными переносчиками с участием трипептида глутатиона.

## **Гниение белков в толстом кишечнике**

Процессу гниения в толстом кишечнике под действием ферментов

гнилостной микрофлоры подвергаются не полностью расщепившиеся белки и отдельные не всосавшиеся аминокислоты. При гниении белков образуются:

1. Токсичные продукты-фенол, скатол, крезол, индол, сероводород, амины,

меркаптан

2. Нетоксичные продукты-кетокилоты, оксикислоты, жирные кислоты, спирты

Продукты гниения белков чрезвычайно токсичны, по системе vena porta, они поступают в печень, где подвергаются процессам обезвреживания.

## **Обезвреживание продуктов гниения белков в печени**

Выделяют несколько вариантов обезвреживания в печени токсичных продуктов гниения белков.

1. Синтез нетоксичной мочевины из чрезвычайно токсичного  $\text{NH}_3$ .
2. Микросомальное окисление токсичных веществ при участии ферментов монооксигеназ. В результате процесса гидроксилирования снижается токсичность, повышается водорастворимость, увеличивается реакционная способность обезвреживаемого вещества.
3. Образование парных нетоксичных соединений путём присоединения к обезвреживаемым продуктам  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , глюконовой кислоты, глицина.



Белки тканей организма постоянно обновляются, то есть подвергается распаду, и постоянно замещаются вновь синтезированными белками.

### Пути образования и использования аминокислот в тканях

В ткани всегда существует определённый *запас аминокислот*. Он поддерживается на достаточно постоянном уровне благодаря сбалансированности путей образования и использования аминокислот.

*Пути пополнения запаса тканевых аминокислот:*

1. аминокислоты, всосавшиеся из кишечника в результате переваривания пищевых белков (1/3 фонда);
2. аминокислоты, образовавшиеся при распаде тканевых белков;
3. синтезированные в тканях заменимые аминокислоты.

серина, треонина

*Пути расходования аминокислот в тканях:*

1. синтез тканевых белков и пептидов;
2. образование небелковых N-содержащих веществ (пуриновые основания, креатинин, биогенные амины, фосфолипиды);
3. использование на энергетические цели;
4. расходование на синтез углеводов (глюконеогенез);
5. образование из аминокислот некоторых метаболитов липидного обмена (кетоновые тела).

Катаболизм аминокислот условно делят на общие реакции (происходят в отношении радикала, аминогрупп, карбоксильных групп) и специфические реакции.

### **Трансаминирование аминокислот**

Начальным процессом деградации аминогрупп является процесс

трансаминирования. Трансаминирование - ферментативный процесс переноса  $\text{NH}_2$ - группы с аминокислоты на  $\alpha$ - кетокислоту при участии ферментов трансаминаз и витамина  $\text{B}_6$ . В процесс трансаминирования могут включаться практически все аминокислоты.

*Биологическое значение реакций трансаминирования* заключается в следующем:

1. происходит потеря аминогрупп из аминокислоты без выделения токсичного  $\text{NH}_3$ ;
2. возможность последующего включения безазотистого остатка аминокислот в цикл Кребса с выделением энергии;
3. способ синтеза новых заменимых аминокислот в тканях

### **Дезаминирование аминокислот**

В тканях различают несколько вариантов дезаминирования: окислительное, непрямое, внутримолекулярное дезаминирование.

#### **Окислительное дезаминирование**

Окислительное дезаминирование – это ферментативный процесс отщепления

$\text{NH}_2$ - группы от аминокислоты после предварительного окисления аминокислоты

*Биологическое значение реакций окислительного дезаминирования* состоит в том, что эта реакция позволяет аминокислотам освободиться от аминогруппы и, переходя в альфа - кетокислоту, включаться в цикл Кребса.

#### **Непрямое дезаминирование**

В тканях для большинства аминокислот реакции трансаминирования и

окислительного дезаминирования тесно друг с другом связаны, Сочетание их получило название непрямого дезаминирования.

Около трети аминокислот включается в непрямое дезаминирование.

#### **Внутримолекулярное дезаминирование**

В процесс внутримолекулярного дезаминирования вступают аминокислоты

гистидин, серин, треонин, цистеин.

#### **Декарбоксилирование аминокислот. Биогенные амины**

Декарбоксилирование аминокислот – ферментативный процесс

высвобождения  $\text{CO}_2$  из  $\text{COOH}$  - групп аминокислот с образованием аминов.

Наиболее активно в процесс декрбокислирования включаются аминокислоты гистидин, тирозин, глутамат, триптофан. Образующиеся амины называются биогенными аминами, поскольку они, как правило, обладают широким спектром физиологических эффектов, влияют на тонус сосудов, являются нейромедиаторами, участвуют в воспалительных реакциях. К основным биогенным аминам относятся гистамин, серотонин, катехоламины, гамма-аминомасляная кислота, полиамины.

### **Образование и обезвреживание аммиака в организме**

Аммиак образуется в результате дезаминирования таких веществ как аминокислоты, амины, пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды.

Аммиак чрезвычайно токсичное вещество. Токсичность аммиака объясняется

многими его эффектами, главным среди которых является связывание альфа-кетокислот и блокирование включения их в цикл Кребса, что нарушает энергетический обмен в тканях. Аммиак может нарушать обмен глутамата и глутамина в ткани мозга, вызывать повышение концентрации глутамата до токсичных концентраций. Кроме того, аммиак вызывает защелачивание в тканях и нарушает транспорт ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$ . В связи с этим концентрация аммиака в тканях и в крови поддерживается на очень низком уровне. В плазме крови она составляет 20-80 мкмоль/л. Такая низкая концентрация обеспечивается наличием в организме различных путей связывания (обезвреживания) аммиака. Эти способы можно разделить следующим образом:

- временные пути (протекают в тканях):
  - восстановительное аминирование альфа-кетокислот;
  - амидирование белков;
  - синтез глутамина;
- образование конечных продуктов азотистого обмена:
  - соли аммония;
  - мочевины.

### **БЕЛКИ ПЛАЗМЫ КРОВИ**

Общее количество белков в плазме крови составляет 7—8%. Общее количество белков в плазме составляет 60-85 г/л. С возрастом количество белков в плазме крови человека уменьшается до 65-67 г/л. В сыворотке крови 0,18-0,37 г/л.

Белки плазмы могут быть подразделены на две фракции, отличающиеся по своим физико-химическим свойствам:

- **сывороточные альбумины**
- **сывороточные глобулины**

Методом электрофореза белки плазмы крови можно разделить на 5 фракций:

- Альбумины 55-65%
- $\alpha_1$  - глобулины 2-4%
- $\alpha_2$  - глобулины 6-12%;
- $\beta$ - глобулины 8-12%
- $\gamma$ -глобулины 12-22%

Содержание белка снижается при заболеваниях печени, сопровождающихся нарушением её белоксинтезирующих функций (циррозы, хронические гепатиты). Падает содержание и при повышении проницаемости сосудов клубочка нефрона (нефротический синдром).

**Физиологическая роль БПК** – общее содержание белков плазмы определяет коллоидно-осмотическое, или онкотическое, давление плазмы. Обладая свойством кислоты и основания, белки плазмы способны выявлять буферные свойства при поступлении в кровь кислот и оснований. Белки плазмы крови принимают непосредственное участие в белковом обмене всего организма. Белки плазмы интенсивно образуются и, очевидно, столь же быстро потребляются. Наряду с некоторыми другими факторами, белки плазмы крови играют существенную защитную роль при внедрении в организм инфекционного начала. Невосприимчивость организма к инфекционным заболеваниям (иммунитет), в особенности приобретаемая в результате перенесенной болезни или проведенных прививок, в ряде случаев зависит от образования особых защитных или иммунных тел белковой природы, поступающих в плазму крови. Во всех случаях, когда в организм попадает чужеродный белок (антиген), в организме образуются так называемые антитела — вещества тоже белковой природы. Местом образования их является ретикуло-эндотелиальная и лимфоидная ткань. В одних случаях эти вещества обезвреживают ядовитые вещества (токсины), выделяемые микроорганизмами (антитоксины). В других случаях в сыворотке крови образуются вещества, или склеивающие микробы (агглютинины), или растворяющие их (л и з и н ы), или осаждающие чужеродные для организма белки (и р е ц и п и т и н ы).

**Сывороточные альбумины** являются белками, имеющими частицы почти шарообразной формы с небольшим молекулярным весом 68 000. Около 40%

альбуминов находится в крови, остальное 60% – в межклеточной жидкости. Эти белки хорошо растворимы в воде и не выпадают в осадок даже в том случае, если путем диализа или электродиализа из раствора целиком удаляются электролиты. При прибавлении электролитов альбумины высаливаются с трудом. Альбумины не осаждаются при половинном насыщении серноокислым аммонием, только при полном насыщении. Содержание альбуминов в плазме крови человека составляет 4—5%. Альбумины удерживают в растворенном состоянии некоторые липоиды и тем самым способствуют их переносу кровью. Они создают 80% онкотического давления плазмы крови. Осуществляют питательную функцию, являются резервом аминокислот для синтеза белков, транспортируют холестерин, жирные кислоты, билирубин, соли желчных кислот, тяжелых металлов, лекарственных препаратов (антибиотиков, сульфаниламидов, барбитуратов, сердечных гликозидов), катионы  $Ca^{2+}$ ,  $Si^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ , прогестерон, тироксин, трийодтиронин Синтезируются в печени. Нормальное содержание – 37-55 г/л сыворотки крови. Снижение содержания наблюдается при нефротическом синдроме, заболеваниях печени, связанных с нарушением её белоксинтезирующей функции (цирроз), ожоги, сепсис.

**Сывороточные глобулины** представляют группу белков с меньшей степенью дисперсности и с неодинаковым молекулярным весом. Молекулярный вес их большой около 100 000. В совершенно чистой воде глобулины нерастворимы. Поэтому при диализе они выпадают в осадок. Глобулины высаливаются уже при половинном насыщении серноокислым аммонием. Количество глобулинов в плазме крови человека составляет примерно 2.5%. Синтезируются в печени, костном мозге, селезенке, лимфатических узлах.

### **$\alpha_1$ -глобулины**

В этой фракции обнаруживается два белка, оценка которых имеет определенное клиническое значение.

$\alpha_1$ -антитрипсин – ингибитор ряда протеиназ: трипсина, химотрипсина, плазмина. На долю этого белка приходится до 90% всей антитрипсиновой активности сыворотки крови. Его содержание повышается при воспалительных заболеваниях и механических повреждениях тканей. В детском возрасте дефицит  $\alpha_1$ -антитрипсина – причина холестаза и цирроза печени, желтух. Нормальное содержание – 2-5 г/л сыворотки.

$\alpha_1$ -гликопротеин – содержит до 41% углеводов, участвует в транспорте прогестерона и тестостерона, связывая небольшие количества этих

стероидов. Содержание возрастает при острых и хронических воспалительных процессах, после оперативных вмешательств, снижается – при циррозе печени. Норма – 0,5-1,4 г/л сыворотки.

### **$\alpha_2$ -глобулины**

$\alpha_2$ -макроглобулин – цинкосодержащий гликопротеин с большой молекулярной массой. Ингибирует протеолитические ферменты – трипсин, химотрипсин, тромбин, плазмин. В отличие от многих белков плазмы синтезируется вне печени. Содержание увеличивается при циррозе, нефротическом синдроме, микседеме и сахарном диабете, не изменяется при остром воспалении, падает при ревматическом полиартрите. Норма – 1,5-4,2 г/л сыворотки. У детей содержание в 2,5 раза выше, чем у взрослых, у мужчин ниже, чем у женщин.

Гаптоглобин – молекула белка состоит из 2-х субъединиц, каждая из которых содержит 4 полипептидные цепи. Связывает и транспортирует свободный гемоглобин А в клетки РЭС. Содержание снижается при поражениях паренхимы печени, гемолитической анемии, увеличивается при остром воспалительном процессе и при сахарном диабете. Норма – 0,0-0,35 г/л, у новорожденных значительно ниже, у плода отсутствует.

Церулоплазмин – медьсодержащий белок с голубой окраской. Окисляет  $Fe^{2+}$  в  $Fe^{3+}$ , что обеспечивает его транспорт трансферрином. Синтез усиливается при беременности или при подавлении овуляции (прием противозачаточных средств). Содержание растет при остром воспалении, холестазах, ревматоидном артрите, снижается при циррозах печени, хроническом гепатите. Норма – 0,25-0,45 г/л.

### **$\beta$ -глобулины**

В этой фракции интерес представляют 2 белка, участвующие в обмене железа:

Трансферрин – белок с красноватой окраской. Участвует в транспорте Fe (III). Содержание снижается при воспалительных процессах, нефротическом синдроме, заболеваниях печени. Норма – 2-4 г/л сыворотки, при беременности выше.

Гемопексин – кислоторастворимый белок, переносит свободный гем, порфирин, связывает гемоглобин, миоглобин, каталазу и доставляет их в клетки РЭС печени, чем снижает потери железа, обеспечивая его реутилизацию. Содержание падает при гемолитической анемии,

заболеваниях печени, нефротическом синдроме, увеличивается – при воспалительных заболеваниях.

### **γ-глобулины**

включают в себя антитела и называются **иммуноглобулинами**. Известно 5 основных классов иммуноглобулинов, отличающихся некоторыми особенностями структуры и биологических свойств (г/л):

IgG	12	Поздние антитела
IgA	3,5	Антитела, защищающие оболочки слизистые
IgM	1,3	Ранние антитела
IgD	0,03	Рецепторы В-лимфоцитов
IgE	<0,01	Реагин

**Фибриноген** — обладает замечательным свойством становиться нерастворимым в определенных условиях и принимать при этом волокнистую структуру, переходя, таким образом, в фибрин. Содержание фибриногена в плазме крови составляет всего 0,3%, но именно его переходом в фибрин обуславливается свертывание крови, благодаря которому жидкая кровь в течение нескольких минут превращается в плотный сгусток.

Он обладает свойствами глобулинов и при электрофорезе обнаруживается между фракциями β- и γ-глобулинов. Является первым фактором свертывания крови. Синтезируется в печени. Концентрация фибриногена в среднем 3-4 г/л. увеличивается содержание этого белка в период беременности, при различных заболеваниях воспалительного характера, злокачественном росте, туберкулезе и др. Понижение содержания наблюдается при заболеваниях печени, при отравлении фосфором или другими токсическими веществами. Синтез этого белка происходит в РЭС печени.

**Диспротеинемия** — нарушение нормального соотношения между фракциями белков, а также появление С-реактивного протеина.;

Наблюдается при воспалительных процессах, опухолях, инфарктах различных органов, коллагенозах. Является чувствительным методом для суждения о минимальной активности хронических воспалительных заболеваний (например, ревматизма, туберкулеза).

- Для острых процессов характерно повышение альфа-2-глобулинов;

- для хронических – гамма-глобулинов.
- Гипермакроглобулинемия патогномична для болезни Вальден-стрема.

По содержанию общего белка сыворотки крови выделяют нормо-, гипо- и гиперпротеинемические диспротеинемии. Все они характеризуются нарушениями в объемных соотношениях разных типов белков.

**Гипопротеинемические диспротеинемии** наиболее часто наблюдаются при недостаточном поступлении белков в организм, потере белков через выпот, кровопотерю, протеинурию или пищеварительный канал, повышении обмена веществ с усилением распада эндогенных белков, как, например, при лихорадочных состояниях, опухолевых процессах, повышении функции щитовидной железы, лучевых повреждениях, нарушениях функции органов, обеспечивающих белковый синтез в организме.

**Гиперпротеинемические диспротеинемии** более часто наблюдаются при воспалительных процессах инфекционной и неинфекционной природы, особенно в случае иммунопатологического воспалительного процесса, характерного для системных заболеваний соединительной ткани, некоторых опухолевых заболеваниях, в первую очередь кроветворных органов.

**Нормопротеинемические диспротеинемии** встречаются при многих из вышеперечисленных заболеваниях и состояниях.

**Электрофоретическое разделение протеинов** позволяет изучать их биологические и физические характеристики, являясь индикатором заболеваний печени и почек, иммунной системы, злокачественной патологии, острых и хронических инфекций, генетических поломок, заболеваний центральной нервной системы и многих других видов патологии.

## 2. ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### 1. Определение общего белка в сыворотке крови по биуретовой реакции (метод калибровочного графика)

Определение общего белка по биуретовой реакции является на сегодняшний день самым распространенным методом определения общего белка в сыворотке крови. Метод относительно дешев, прост, обладает хорошей воспроизводимостью и специфичностью, использование его позволяет выполнять исследование как на



анализаторах (автоматических и полуавтоматических), так и на обычном фотометре.

### Принцип метода

Белки реагируют в щелочной среде с сульфатом меди с образованием комплексных соединений, окрашенных в фиолетовый цвет. По интенсивности окрашивания, которое пропорционально количеству белка, определяют содержание его в сыворотке крови.

### Подготовка пациента

Для определения общего белка крови по биуретовой реакции кровь желательно брать утром натощак.

### Реактивы

1. Натрия хлорид, ч. д. а. или х. ч., 154 ммоль/л (изотонический раствор): 9 г хлорида натрия помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, растворяют в воде и доводят до метки водой.
2. Натр едкий, ч. д. а. или х. ч., 0,2 моль/л: 8 г едкого натра помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, осторожно растворяют в воде и доводят до метки водой.
3. Калия йодид, ч. д. а. или х. ч., 30 ммоль/л раствор йодида калия в 0,2 моль/л растворе едкого натра: 0,5 г йодида калия помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят 0,2 моль/л раствором едкого натра до метки и растворяют. Реактив стабилен в течение 2 недель при хранении в посуде из темного стекла.
4. Калий-натрий виннокислый 4-водный (сегнетова соль) ч. д. а.
5. Меди сульфат 5-водный ч. д. а. или х. ч.
6. Биуретовый реактив: 4,5 г сегнетовой соли растворяют в 40 мл 0,2 моль/л едкого натра, прибавляют 1,5 г сульфата меди и 0,5 г йодида калия и растворяют. Доливают до 100 мл 0,2 моль/л раствором едкого натра. Реактив стабилен при хранении в посуде из темного стекла не более месяца.
7. Рабочий раствор биуретового реактива: 20 мл биуретового реактива смешивают с 80 мл 0,5% раствора йодида калия. Реактив хранят в темном месте не более 2 недель.
8. Калибровочный раствор альбумина (из человеческой или бычьей сыворотки) - 100 г/л раствор альбумина в 154 ммоль/л растворе хлорида натрия: 1 г альбумина из человеческой или бычьей сыворотки растворяют в 6 — 7 мл 0,9% раствора хлорида натрия и доводят изотоническим

раствором хлорида натрия до объема 10 мл; 1 мл стандартного раствора содержит 0,1 г белка.

### **Материал для исследования**

Для анализа могут использоваться как сыворотка, так и плазма. При этом обычно получают сравнимые результаты, хотя, из-за присутствия фибриногена, уровень общего белка в плазме на 2–4 г/л выше, чем в сыворотке.

Определение содержания белка в сыворотке, полученной в вакуумных системах с разделяющим гелем и без него, дает сопоставимые результаты. Не было получено существенных различий в содержании белка в образцах крови, собранных в стеклянных или пластмассовых вакуумных системах.

Для исследования не следует использовать гемолизированную сыворотку, так как гемоглобин также является белком и будет вступать в биуретовую реакцию, что приведет к ложному завышению результатов анализа: присутствие гемоглобина приводит к завышению результатов на 3 % на каждый 1 г/л свободного гемоглобина в сыворотке.

Нежелательно использовать хилезную сыворотку, так как она из-за мутности будет оптически интерферировать с результатами определения, а следовательно приведет к ложному завышению результатов. Для устранения интерференции, вызванной значительной липемией применяют экстракцию диэтиловым эфиром. При незначительном присутствии липидов можно провести исследование, установив "бланк" по пробе больного, либо развести пробу изотоническим раствором хлорида натрия, а затем умножить результат на степень разведения.

Интерферирующее действие оказывает и билирубин при концентрации более 85 мкмоль/л. Поэтому в случае гипербилирубинемии также используют либо разведение сыворотки, либо установку «бланка» по пробе больного.

В ряде случаев в реакцию могут вмешиваться препараты, применяющиеся для лечения, особенно у тяжелых больных. Так, например, декстраны, используемые в качестве плазмозамещающих растворов, образуют комплекс с медью и тартратом в реакционной смеси и приводят к образованию рыхлого синего осадка. Степень вмешательства зависит от концентрации декстрана и состава биуретового реактива. При вводимых обычно количествах декстрана величина ошибки может составлять от 3 до 50 %. Полагают, что добавление глицерина в реактив или использование низкой концентрации NaOH способны предотвратить

вмешательства декстрана в ход реакции. Присутствие в образце ионов аммония может способствовать образованию комплексов аммония с ионами меди, приводить к снижению концентрации ионов меди в реакционной среде, и, соответственно, к снижению скорости реакции и ложноотрицательным результатам. В редких случаях вмешательство лекарственных препаратов, находящихся в сыворотке таково, что при взаимодействии биуретового реактива с сывороткой наблюдается либо развитие окраски, отличной от фиолетовой, либо появление мутности. Оценить количество белка в такой сыворотке невозможно.

Содержание общего белка устойчиво в сыворотке и плазме в течение 1 недели при комнатной температуре и, по крайней мере, 2 месяца при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **Ход определения общего белка в сыворотке крови по биуретовой реакции**

Опытная проба: к 0,1 мл сыворотки прибавляют 5 мл рабочего раствора биуретового реактива и смешивают, избегая образования пены. Через 30 минут (и не позднее чем через час) измеряют на фотометре в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 500 — 560 нм (зеленый светофильтр) против холостой пробы.

Холостая проба: к 5 мл рабочего биуретового реактива прибавляют 0,1 мл 154 ммоль/л раствора хлорида натрия, далее обрабатывают как опытную пробу.

Расчет ведут по калибровочному графику.

Построение калибровочного графика: из калибровочного раствора готовят рабочие растворы как указано ниже.

<b>№ пробирки</b>	<b>Калибровочный раствор альбумина, мл</b>	<b>154 ммоль/л раствор хлорида натрия, мл</b>	<b>Концентрация альбумина, г/л</b>
1	0,2	0,8	20
2	0,4	0,6	40
3	0,6	0,4	60

4	0,8	0,2	80
5	1	-	100

Из каждого разведения берут по 0,1 мл рабочего раствора и прибавляют по 5 мл рабочего биуретового реактива; через 30 — 60 минут измеряют на фотометре, как в опыте, против холостой пробы, начиная с наименьшей концентрации. По полученным данным строят калибровочный график. Калибровочная кривая линейна до 100 г/л альбумина.

## **Работа № 2. Определение общего белка в сыворотке крови биуретовым методом (с помощью стандартного раствора).**

Принцип метода: в щелочной среде белок образует с ионами меди комплексное соединение фиолетового цвета, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации белка в пробе (сыворотка крови, плазма).

Оборудование:

штатив с пробирками,

микропипетки – дозаторы,

наконечники, пипетки на 1 или 2 мл,

кюветы толщиной 3 мм или 5 мм,

ФЭК,анализатор

Исследуемый материал: сыворотка крови.

Реактивы:

1) реагент - биуретовый реактив, готовый к использованию.

2) калибратор – калибровочный раствор альбумина, 70 г/л, готовый к использованию.

Ход работы: Отмерить

	Опытная проба	Стандартная проба	Калибратор
Сыворотка крови	0,02мл	0,02мл	0,02мл



вым зеленым в слабокислой среде образуется комплекс зеленого цвета, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации альбумина в пробе.

Оборудование:

ФЭК,

микропипетки-дозаторы,

наконечники, штатив с пробирками,

кюветы толщиной слоя 3 мм,

пипетки объемом 1 мл или 2 мл.

Реактивы: – набор реагентов «Альбумин-Ново» ЗАО «Вектор-Бест».

Состав: Реагент (Р) – раствор бромкрезолового зеленого в сукцинатном буфере, готовый к использованию.

Калибратор – калибровочный раствор альбумина, 40 г/л, готовый к использованию.

Исследуемый материал. Негемолизированная сыворотка, гепаринизированная или ЭДТА – плазма крови.

Ход работы. Добавить в две пробирки реагенты согласно таблице:

	Опытная проба	Калибровочная проба
Калибратор		0,01
Проба (сыворотка, плазма)	0,01	
Реагент	по 1,0	мл в опыт .и калибр.пробы

Перемешать, выдержать несколько минут, измерить оптическую плотность опытной (А) и калибровочной (К) проб против реагента.

Измерить в кюветах с длиной оптического пути 3 или 5 мм при длине волны 628 (578-640) нм. Окраска стабильна в течение 2-х часов.

Расчет. Концентрация альбумина в пробе (С) в г/л рассчитать по формуле:

$C = A / K \cdot 40$  22 Норма содержания альбумина сыворотки крови: 37-53 г/л.

**Клинико - диагностическое значение.** Основные функции альбумина: связывание и транспорт некоторых катионов, малых и больших анионов, жирных кислот, билирубина, витамина С, лекарств, ксенобиотиков; поддержание постоянства коллоидно-осмотического (онкотического) давления и обеспечение клеток аминокислотами. Время полужизни - 15-20 дней. Гипоальбуминемия наблюдается при: а) снижении его синтеза в печени (цирроз печени, недоедание (кахексия), синдром мальабсорбции); б) повышении катаболизма (травма, инфекция, сепсис, лихорадка, гипоксия, синдром Кушинга, гипертиреоз, гиперкортицизм, злокачественные опухоли); в) аномальных потерях (шок, кровотечение, энтероколиты, нефротический синдром); г) патологическом распределении (после оперативных вмешательств, при ожогах, токсикозе, асците, плеврите). Гиперальбуминемия наблюдается при остром обезвоживании, при приеме анаболических стероидов.

#### ЛИТЕРАТУРА.

1. Практика лабораторных биохимических исследований: учебное пособие. Пустовалова Л.М. – Ростов н/Д.: Феникс, 2014
2. Теория лабораторных биохимических исследований (основы биохимии): учебное пособие. Пустовалова Л.М. – Ростов н/Д.: Феникс, 2014
3. Теория и практика лабораторных биохимических исследований учебник/Н.В.Любимова,И.В.Бабкина,Ю.С.Тимофеев-М.:ГЭОТАР-Медиа,2020.416с.:ил.

### Задания для самоконтроля

#### 1. Ситуационные задачи

1) Отношение количества альбуминов к количеству глобулинов в сыворотке крови больного равно 1,5. Рассчитайте содержание глобулинов, если концентрация альбуминов равна 50 г/л.

2) Определить концентрацию общего белка у пациента,если:

опт.пл.опытной пробы- 0,54

опт.пл.калибровочной пробы- 0,50

концентрация альб.в калибровочном р-ре-60г/л

## 2. Проверочные тесты

Выберите один правильный ответ

1. Белки – биополимеры, мономерами которых являются:

- а) карбоновые кислоты
- б) амины
- в)  $\beta$ -аминокислоты
- г)  $\alpha$ -аминокислоты
- д) амиды карбоновых кислот.

2. В белках аминокислотные остатки связаны между собой:

- а) сложноэфирными связями
- б) водородными связями
- в) пептидными связями
- г) ангидридными связями
- д) гликозидными связями

3. К основным аминокислотам относится:

- а) аланин
- б) лизин
- в) тирозин
- г) глутамин
- д) триптофан

4. К кислым аминокислотам относится:

- а) лейцин
- б) цистеин
- в) аспарагиновая кислота
- г) треонин
- д) валин

5. В изоэлектрической точке пептиды имеют:

- а) отрицательный заряд
- б) положительный заряд
- в) нейтральны

6. Между остатками треонина и глутамина при формировании третичной структуры белка возникает:

- а) ионная связь
- б) ковалентная связь

7. Первичная структура белка – это:

- а) аминокислотный состав полипептидной цепи
- б) линейная структура полипептидной цепи, образованная ковалентными связями между аминокислотными остатками



в) порядок чередования аминокислот в полипептидной цепи, соединенных пептидными связями, образованными  $\alpha$ -карбоксильной группой одной аминокислоты и  $\alpha$ -аминогруппой другой аминокислоты

г) структура полипептидной цепи, стабилизированная связями

8. Вторичная структура белка:

а) пространственное, трехмерное расположение полипептидной цепи, фиксированной межрадиальными связями, гидрофобными взаимодействиями

б) порядок чередования  $\alpha$ -аминокислот в полипептидной цепи, соединенных пептидными связями

в) объединение в определенном порядке двух или большего числа протомеров в молекуле олигомерного белка посредством не ковалентных связей

г) способ укладки полипептидной цепи в виде  $\alpha$ -спирали

9. Третичная структура белка:

а) пространственное, трехмерное расположение полипептидной цепи, фиксированной межрадиальными связями

б) порядок чередования  $\alpha$ -аминокислот в полипептидной цепи, соединенных пептидными связями

в) объединение в определенном порядке двух или большего числа протомеров в молекуле олигомерного белка посредством не ковалентных связей и взаимного узнавания комплементарных контактных поверхностей

г) способ укладки полипептидной цепи в виде  $\alpha$ -спирали

10. Четвертичная структура белка:

а) пространственное, трехмерное расположение полипептидной цепи, фиксированной межрадиальными связями, гидрофобными взаимодействиями

б) порядок чередования  $\alpha$ -аминокислот в полипептидной цепи, соединенных пептидными связями

в) объединение в определенном порядке двух или большего числа протомеров в молекуле олигомерного белка посредством не ковалентных связей

г) способ укладки полипептидной цепи в виде  $\alpha$ -спирали

11. Белки – биополимеры, мономерами которых является:

а) карбоновые кислоты

б) амины

в)  $\beta$ -аминокислоты

г)  $\alpha$ -аминокислоты

д) амиды карбоновых кислот

12. В белках аминокислотные остатки связаны между собой:

а) сложноэфирными связями

б) водородными связями

в) пептидными связями

г) ангидридными связями

д) гликозидными связями

13. В изоэлектрической точке пептиды имеют:

а) отрицательный заряд

б) положительный заряд

в) нейтральны

### **3. Вопросы**

1) Закончите определение:

Аминокислотами называют \_\_\_\_\_.

---

2) Какие связи в белковой молекуле вы знаете, укажите сильные и слабые.

3) Перечислите ферменты, принимающие участие в переваривании белков в ЖКТ

4) Гниение белков в кишечнике это...

5) Назвать основные пути обмена аминокислот.

6) Классификация белков плазмы крови.

7) Диагностическое значение общего белка и альбумина.

основные причины гипо- и гиперпротеинемии, гипо- и гиперальбуминемии.